

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
KLINISCHE CHEMIE UND LABORATORIUMSMEDIZIN
KOMMISS. LEITER PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EFFEKTE VON INTENSIVER KÖRPERLICHER BELASTUNG AUF
MONOZYTENSUBPOPULATIONEN IN PATIENTEN MIT METABOLISCHEM
SYNDROM

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ralph Wonner

2017

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
KLINISCHE CHEMIE UND LABORATORIUMSMEDIZIN
KOMMISS. LEITER PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EFFEKTE VON INTENSIVER KÖRPERLICHER BELASTUNG AUF
MONOZYTENSUBPOPULATIONEN IN PATIENTEN MIT METABOLISCHEM
SYNDROM

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ralph Wonner

2017

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. André Gessner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Marcus Fischer
Tag der mündlichen Prüfung:	28.04.2017

Effekte von intensiver körperlicher Belastung auf Monozyten- Subpopulationen in Patienten mit Metabolischem Syndrom

Inhalt

1. Zusammenfassung.....	2
1.1. Einleitung.....	2
1.2. Material und Methoden.....	4
1.3. Ergebnisse	7
1.4. Diskussion	14
1.5. Abkürzungsverzeichnis.....	17
1.6. Literaturverzeichnis	18
2. Originalpublikation.....	22
3. Vorträge und Posterpräsentationen	33
4. Danksagungen	34
5. Lebenslauf	35

1. Zusammenfassung

1.1. Einleitung

Das Metabolische Syndrom ist eine komplexe Stoffwechselstörung, die durch abdominelle Fettleibigkeit, Fettstoffwechselstörungen, Bluthochdruck und Insulinresistenz charakterisiert ist [1]. Es stellt einen der Hauptrisikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen dar und geht mit einer chronischen subklinischen/geringgradigen Entzündungsreaktion einher, die sich u.a. durch erhöhte Serumkonzentrationen von proinflammatorischen Biomarkern zeigt [2].

Monozyten spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen Abwehrreaktion des Körpers und sind auch Teil der metabolischen Regulierung [3] sowie der Bildung von atherosklerotischen Plaques [4]. Entsprechend ihrer Ausprägung des Fc-gamma-Rezeptors (FcγR) III (CD16) und des Polysaccharid-Rezeptors (CD14) können Monozyten in mehrere Untergruppen aufgeteilt werden. Man spricht dann von CD14^{bright}CD16^{neg}, CD14^{bright}CD16^{pos} und CD14^{dim}CD16^{pos} Monozyten. Diese werden entsprechend als MNP (mononuclear phagocytic subpopulation) 1, MNP2 und MNP3 bezeichnet [5-7]. Die CD14 und CD16 doppelt positiven Monozyten, MNP2 und MNP3 werden im allgemeinen auch als proinflammatorische Monozyten angesehen [6].

Letztgenannten Zellen wird eine besondere Bedeutung in der Pathogenese der Atherosklerose zugesprochen, da sie die Fähigkeit besitzen, große Mengen an Lipiden aufzunehmen und sich dadurch in sog. Schaum-Zellen (*engl. foam-cells*) zu verwandeln [8, 9]. Außerdem wurde gezeigt, dass sich dieser Zelltyp auch in der Ausprägung anderer Oberflächenmoleküle von den CD16 negativen Zellen unterscheidet sowie am stärksten differenziert ist [5, 10, 11]. Die MNP3 Subpopulation stellt dabei den am weitesten differenzierten Phänotyp dar [12].

Nicht nur CD16, auch die anderen Fc-gamma-Rezeptoren FcγRI (CD64) und FcγRII (CD32) zeigen verschieden hohe Ausprägungen auf den Monozytensubpopulationen. CD64 ist der vorherrschende Fcγ-Rezeptor auf den MNP1 Zellen, wohingegen CD32 auf den MNP2 Zellen am ausgeprägtesten ist [9, 13]. CD32 spielt, genauso wie andere Opsoninrezeptoren, die Hauptrolle in der Erkennung und Phagozytose von eLDL (enzymatisch verändertes LDL), das ein wirksamer Auslöser für die Bildung von Schaumzellen ist [14].

In Personen mit einer akuten oder subakuten Entzündung, findet sich ein größerer Anteil von CD16 positiven Monozyten [10]. Dazu gehören unter anderem Patienten mit AIDS [15], Krebs [16] oder Sepsis [17]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Größe speziell der CD14^{dim}CD16^{pos} Monozytenpopulation negativ mit der Serumkonzentration von HDL-Cholesterin und positiv mit den Serumkonzentrationen von Triglyzeriden und Gesamtcholesterin sowie dem Vorhandensein des ApoE4-Allels korreliert [5, 13]. Dies deutet daraufhin, dass sowohl gewisse metabolische Zustände, als auch chronische Entzündungsreaktionen zu einer vermehrten Ausreifung von CD14^{dim}CD16^{pos} Monozyten führen [13].

Intensive körperliche Belastung erhöht die Zahl der Leukozyten im peripheren Blut. Vor allem die Zahl der CD14^{pos}CD16^{pos} Monozyten steigt nach intensiver Anstrengung stark an (bis zu 4,8-fach) [18-20]. Man geht davon aus, dass die Zellen zumindest teilweise aus dem Randstrom des Blutes mobilisiert werden. In diesem herrscht eine durch Scherkräfte bedingte niedrigere Flussgeschwindigkeit des Blutes und er beinhaltet Zellen, die durch die Interaktion von Oberflächenmolekülen am Gefäßendothel hängen oder entlang rollen [21-23]. Zusätzlich konnte die Freisetzung von Monozyten aus der Milz gezeigt werden [24].

Es könnte also auch möglich sein, dass der Anstieg von CD16 positiven Monozyten bei den oben genannten Krankheitsbildern nicht nur durch eine vermehrte Ausreifung, sondern auch durch eine vermehrte und chronische Mobilisierung dieser Zellen aus dem Randstrom des Blutes verursacht ist, wie schon Steppich et al. vermutet haben [20].

Es gibt aktuell keine Daten über die Verteilung von Monozyten-Subpopulationen in Patienten mit Metabolischem Syndrom und deren Mobilisierung durch körperliche Anstrengung. Ebenso ist unbekannt, ob die chronisch erhöhten Zahlen von proinflammatorischen Monozyten in diesen Patienten durch körperliche Belastung noch weiter gesteigert werden können, wie es in gesunden Testpersonen der Fall ist. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Auswirkung von intensiver körperlicher Belastung auf Zellzahlen, speziell die der proinflammatorischen Monozyten in Patienten mit Metabolischem Syndrom im Vergleich zu gesunden Probanden und Personen mit Risiken für die Entwicklung eines Metabolischen Syndroms untersucht. Des Weiteren wurde dem Effekt auf den Lipid- und Proteingehalt von Granulozyten und Monozyten sowie auf eine Auswahl weiterer Laborparameter nachgegangen.

1.2. Material und Methoden

Rekrutierung der Probanden und Ergometer Protokoll

Es wurden freiwillige Teilnehmer unter den Angestellten des Krankenhauses rekrutiert. Zu den Ausschlusskriterien für die Studie gehörten das Vorliegen einer koronaren Herzerkrankung, orthopädische Probleme sowie alle Erkrankungen, die die Probanden während dieser intensiven körperlichen Belastung gefährden könnten. Eine akute systemische Infektion wurde vor Beginn des Versuchs klinisch sowie laborchemisch ausgeschlossen. Die Probanden waren seit mindestens acht Stunden nüchtern sowie sollten 12 Stunden vor Versuchsdurchführung keine anstrengenden Tätigkeiten verrichten. Nach ausführlicher Erklärung des Ablaufs und Einholen der schriftlichen Einverständniserklärung des Teilnehmers wurden Größe, Gewicht, Bauchumfang auf Bauchnabelhöhe sowie der Blutdruck gemessen. Alle Untersuchungen fanden morgens statt.

Für die körperliche Aktivität wurde ein Fahrrad-Ergometer mit einstellbarer Leistung verwendet. Der genau Ablauf des Radfahrens erfolgte in Anlehnung an die Protokolle von Steppich et al. [20] und Gabriel et al. [25].

Die körperliche Betätigung begann mit einer kurzen, einige Sekunden andauernden Aufwärmphase auf der 100W Leistungsstufe, wurde dann in ungefähr fünf Sekunden kontinuierlich bis 400W gesteigert und für 60 Sekunden oder bis zur körperlichen Erschöpfung aufrechterhalten. Während der gesamten Durchführung erfolgte die Beobachtung von EKG, Herzfrequenz sowie Trittfrequenz. Die Blutproben wurden vor sowie nicht länger als eine Minute nach Beendigung der Ergometer-Aktivität aus einer peripheren Vene abgenommen.

Der Versuchsablauf wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Regensburg bewilligt (Antrag 08/119).

Routine-Laborparameter und Zellzahlen

Die Serumkonzentrationen von Gesamtprotein, Albumin, Gesamtcholesterin, HDL- und LDL-Cholesterin, der HDL-Subfraktion HDL3, Triglyzeriden, Apolipoprotein (Apo) A-1, ApoB-100, des C-reaktiven Proteins (CRP), Komplement-Faktor 3c (C3c) und 4 (C4), Glukose und freiem Hämoglobin wurden auf einem Dimension Vista System von Siemens bestimmt. Die Laktatkonzentration wurde in Natriumfluorid-haltigen Blutproben auf demselben Gerät gemessen. Die HDL-Subfraktion HDL2 wurde mittels der HDL- und HDL3-Werten berechnet.

Kommerzielle ELISA-Kits wurden für die Bestimmung der Serumkonzentrationen von oxidiertem LDL (oxLDL) (Mercodia, Schweden), ApoB-48 (Shibayagi, Japan), ApoC-2 und ApoC-3 (AssayPro, USA) verwendet. Die Messung der Serumkonzentrationen von ApoE erfolgte mit einem BN proSpec II System (Siemens, Deutschland) und die von Interleukin 6 (IL-6) mit einem Cobas e411 System (Roche Diagnostics, Schweiz).

Die Konzentrationen von Leukozyten, Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Thrombozyten wurden mit einem Sysmex XE-5000 Analysator (Sysmex, Japan) bestimmt.

Identifizierung der Monozyten Subpopulationen mittels Durchflusszytometrie

Es wurden 100µl EDTA-Vollblut zunächst mit 5µl mit PC7 konjugiertem CD14-Antikörper (CD14-PC7) (Becton Dickinson) und 5µl mit APC konjugiertem CD16-Antikörper (CD16-APC) (Caltag Laboratories, UK) 15 Minuten lang auf Eis inkubiert und anschließend die Erythrozyten lysiert. Nach mehrmaligem Zentrifugieren und Waschen der Proben erfolgte die Analyse auf einem BD Canto II Durchflusszytometer. Sog. Scatter Gates wurden um die Monozyten-Population gelegt und insgesamt 10.000 Ereignisse gemessen. Die Prozentzahlen der CD14^{bright}CD16^{neg}, CD14^{bright}CD16^{pos} und CD14^{dim}CD16^{pos} Monozyten wurden in einem „dot plot“ ermittelt und die absoluten Zellzahlen dieser Subpopulationen anhand der Ergebnisse des Sysmex-Analysators berechnet.

Lipidbestimmung

Für die gezielte Bestimmung des Gehalts verschiedener Lipidspezies in Granulozyten und Monozyten wurden diese Zellen mit einem autoMACS Pro Magnetseparator (Miltenyi Biotec, Deutschland) aus Vollblutproben isoliert. Für die Isolation von Granulozyten wurden magnetisch markierte CD15 Antikörper und für die darauffolgende Separation von Monozyten aus derselben Blutprobe CD14 Antikörper verwendet (beide Miltenyi Biotec, Deutschland). Die Konzentration der Zellen in den erhaltenen Isolaten wurde auf dem Sysmex Zellzähler analysiert.

Nach dem Waschen und Zentrifugieren der Zellen wurden diese lysiert, zerkleinert und der Proteingehalt der Probe mittels BCA-Assay (Uptima-Interchim, Frankreich) bestimmt.

Die Extraktion der Lipide und die massenspektrometrische Analyse wurde nach den im Institut gängigen Verfahren durchgeführt [26-34]. Der Lipidgehalt wurde in nmol

pro mg Protein bestimmt und mittels der gemessenen Zellkonzentration in den Zellisolaten wurde der Lipidgehalt pro Millionen Zellen berechnet.

Berechnung der Volumenänderungen

Bei allen Ergebnisse aus den Proben, die nach dem Versuch auf dem Ergometer entnommen wurden, erfolgte eine rechnerische Korrektur für die Plasma- und Blutvolumenänderung anhand der Konzentrationsänderung des Hämoglobins nach der Methode von Dill et al. [35].

Einteilung der Studiengruppen

Die Studienteilnehmer wurden anhand der ATP III Kriterien für das Metabolische Syndrom in drei Gruppen eingeteilt (Kontrollgruppe, Risikogruppe und Metabolisches-Syndrom-Gruppe) [36]. Ein Metabolisches Syndrom lag vor, wenn drei oder mehr der folgenden Kriterien erfüllt waren: Blutdruck $\geq 130/85$ mmHg oder antihypertensive Therapie, Bauchumfang ≥ 102 cm bei Männern und ≥ 88 cm bei Frauen, HDL-Cholesterin ≤ 40 mg/dl bei Männern und ≤ 50 mg/dl bei Frauen, Triglyzeride ≥ 150 mg/dl und Nüchtern-Glukose ≥ 100 mg/dl oder medikamentöse antihyperglykämische Therapie. Wenn ein oder zwei Kriterien erfüllt waren, wurden die Probanden in die Risikogruppe eingeordnet und alle Probanden ohne Risikokriterium stellen die Kontrollgruppe dar.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 20.0 (IBM). Um die Unterschiede zwischen den Gruppen für die Parameter jeweils vor und nach der Ergometer Betätigung sowie die Unterschiede der Änderung der Parameterwerte auf Signifikanz zu testen wurde der Kruskal-Wallis Test sowie der Mann-Whitney U Test verwendet. Der Wilcoxon Rangsummentest wurde benutzt um signifikante Veränderungen der gemessenen Werte durch die körperliche Aktivität zu identifizieren. Für nominale Variablen wurde der Chi-Quadrat Test verwendet. Wenn nicht anders bezeichnet, werden alle Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Statistische Signifikanz wurde erreicht bei einem p-Wert $< 0,05$.

1.3. Ergebnisse

Charakterisierung der Probanden

Insgesamt nahmen 23 Personen an dem Versuch teil und wurden anhand der ATP III Kriterien in drei Gruppen eingeteilt: sechs Personen in die Metabolische-Syndrom-Gruppe, sieben in die Risikogruppe und zehn in die Kontrollgruppe. Die Gruppen unterschieden sich signifikant in den Werten von Blutdruck, Körpergewicht, BMI, Bauchumfang, HDL-Cholesterin, Nüchtern-Glukose und Alter (siehe Tabelle 1). Der Altersdurchschnitt in der Kontrollgruppe war signifikant niedriger als in den anderen beiden Gruppen.

Tabelle 1 Eigenschaften der Probanden

	Kontrollgruppe (n=10)	Risikogruppe (n=7)	Metabolisches Syn- drom-Gruppe (n=6)	p-Wert
Geschlecht, männlich/weiblich	4/6	3/4	4/2	0,558
Alter	34 ± 10	48 ± 5	43 ± 6	0,007
Größe [m]	1,70 ± 0,09	1,70 ± 0,07	1,76 ± 0,10	0,527
Gewicht [kg]	63,2 ± 7,2	74,1 ± 13,6	106 ± 20,5	0,001
BMI [kg/m ²]	21,7 ± 1,5	25,4 ± 3,3	34,4 ± 6,1	0,001
Bauchumfang [cm]	73,4 ± 6,3	85,1 ± 12,1	110,8 ± 14,1	0,001
HDL – Cholesterin [mg/dl]	73,0 ± 14,2	65,0 ± 13,1	35,0 ± 11,7	0,002
Triglyceride [mg/dl]	109,3 ± 25,3	118,1 ± 52,7	565,5 ± 815,3	0,080
Systolischer Blutdruck [mmHg]	120 ± 7	134 ± 6	146 ± 16	0,001
Diastolischer Blutdruck [mmHg]	79 ± 10	89 ± 9	97 ± 9	0,012
Nüchtern glukose [mg/dl]	83,7 ± 10,9	90,3 ± 6,2	120,8 ± 64,2	0,017

Mittelwert ± Standardabweichung. Die P-Werte für signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurde mittels Chi-Quadrat-Test für die Geschlechtsverteilung sowie Kruskal-Wallis-Test für die metrischen Daten ermittelt.

Ergometer-Belastung

In allen drei Gruppen war die Serumlaktatkonzentration nach der körperlichen Belastung massiv erhöht (Kontrollgruppe: 80 ± 20,7 mg/dl; Risikogruppe: 64,4 ± 16,7 mg/dl; Metabolisches Syndrom Gruppe 71,6 ± 18,4 mg/dl; interner Laborreferenzwert 3,6 – 18,2 mg/dl). Erhöhte Laktatwerte deuten auf anaerobe Belastung hin und korrelieren gut mit der Intensität derselben. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass der vergleichbare Laktatwert und die ähnliche durchschnittliche Herzfrequenz der Gruppen eine gleichwertige Belastung widerspiegeln.

Aufgrund von acht Probanden, die die Ergometer-Belastung wegen körperlicher Erschöpfung vorzeitig abbrechen mussten, wurden unterschiedliche, wenn auch nicht signifikant unterschiedliche Belastungszeiten erreicht, $55,8 \pm 8,9$ Sekunden bei den Kontrollprobanden, $49 \pm 12,4$ Sekunden in der Risikogruppe und $56,7 \pm 5,2$ Sekunden bei den Patienten mit Metabolischem Syndrom. In einer Pilotstudie konnten wir jedoch zeigen, dass die Mobilisierung der CD14 CD16 doppelt positiven Monozyten sich nicht signifikant zwischen den Versuchspersonen, die eine Minute bei 400 Watt Belastung vollständig durchhielten und denen, die vorzeitig abbrechen mussten, unterscheiden.

Veränderungen in den Serumparametern

Es wurden Routinebestimmungen von Laborparametern, die unter anderem mit dem Fettstoffwechsel und Entzündungsreaktionen in Zusammenhang stehen durchgeführt. Es konnten signifikante Veränderungen von HDL2, HDL3, C3c und C4 in der Kontrollgruppe und von HDL, LDL, HDL3, Apo-AI, C3c und C4 in der Risikogruppe gesehen werden. In der Gruppe mit Metabolischem Syndrom konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

Zwischen den Gruppen zeigen sich signifikant unterschiedliche Ausgangswerte von ApoB100, C4 und oxLDL sowie signifikant unterschiedliche Werte von ApoB100, C3c, C4 und oxLDL nach Belastung.

Eine genaue Auflistung mit allen Werten findet sich in Tabelle 2.

Tabelle 2 Werte der Routineparameter vor und nach körperlicher Belastung

	Control		Risk		Metabolic Syndrome	
	before	after	before	after	before	after
Protein [g/l]	74.11 ± 2.85	73.74 ± 3.41	73.56 ± 3.60	71.87 ± 3.36	75.17 ± 5.09	75.23 ± 4.34
Albumin [g/l]	41.52 ± 3.53	40.67 ± 3.72	40.87 ± 1.89	40.30 ± 1.79	40.70 ± 1.94	39.96 ± 1.60
Cholesterol [mg/dl]	191.90 ± 33.38	190.41 ± 33.31	217.29 ± 36.11	211.43 ± 34.44	204.50 ± 39.87	203.53 ± 36.6
Triglycerides [mg/dl]	109.30 ± 25.36	105.89 ± 25.63	118.14 ± 52.63	112.64 ± 51.06	565.50 ± 815.28	545.31 ± 777.46
HDLc [mg/dl]	73.00 ± 14.21	72.62 ± 13.73	65.00 ± 13.12	63.34 ± 12.79	35.0 ± 11.73	35.02 ± 12.79
LDLc [mg/dl]	103.70 ± 23.97	103.09 ± 24.71	135.71 ± 29.61	131.24 ± 29.44	106.33 ± 27.38	106.11 ± 29.02
HDL2 [mg/dl]	24.00 ± 7.47	26.18 ± 8.43	27.29 ± 14.10	24.01 ± 6.98	8.67 ± 4.55	9.37 ± 6.01
HDL3 [mg/dl]	49.00 ± 7.59	46.54 ± 6.66	42.00 ± 5.94	39.33 ± 6.12	26.33 ± 7.39	25.65 ± 7.12
oxLDL	42.48 ± 13.08*	44.16 ± 12.28*	71.87 ± 26.82*	62.51 ± 18.68*	63.21 ± 20.79*	67.89 ± 8.59*
Apo A-I [mg/dl]	197.1 ± 30.89	195.43 ± 30.14	178.00 ± 24.95	171.46 ± 21.05	136.00 ± 12.62	139.53 ± 16.14
Apo B-100 [mg/dl]	84.21 ± 16.19*	84.33 ± 16.77*	106.14 ± 16.67*	102.77 ± 16.54*	108.32 ± 18.39*	108.12 ± 15.12*
Apo B-48 [µg/ml]	9.20 ± 5.96	9.37 ± 6.00	5.64 ± 2.89	5.47 ± 3.12	37.13 ± 54.38	39.73 ± 63.54
Apo C-II [mg/dl]	4.72 ± 1.53	4.92 ± 1.63	5.53 ± 2.07	5.38 ± 1.51	11.68 ± 11.63	14.09 ± 13.18
Apo C-III [mg/dl]	14.78 ± 4.33	14.47 ± 3.42	15.36 ± 5.74	15.65 ± 4.67	30.34 ± 28.16	35.33 ± 29.31
Apo E [mg/dl]	3.50 ± 0.50	3.54 ± 0.54	3.87 ± 0.875	3.77 ± 0.86	7.70 ± 8.67	7.72 ± 8.09
IL-6 [pg/ml]	2.00 ± 0.00	2.04 ± 0.12	2.00 ± 0.00	2.02 ± 0.05	3.02 ± 2.46	3.10 ± 2.04
CRP [mg/l]	3.13 ± 0.53	3.22 ± 0.71	3.10 ± 0.53	3.09 ± 0.51	3.05 ± 0.367	3.08 ± 0.43
C3c [mg/dl]	110.77 ± 12.25	104.54 ± 15.33*	114.71 ± 6.80	111.75 ± 7.57*	134.50 ± 24.28	137.15 ± 22.10*
C4 [mg/dl]	19.36 ± 4.19*	22.32 ± 7.15*	24.13 ± 2.75*	25.77 ± 3.11*	29.55 ± 7.35*	31.28 ± 8.07*
Free hemoglobin [mg/l]	217.69 ± 112.62	231.22 ± 92.52	150.29 ± 43.31	173.90 ± 57.08	236.32 ± 82.52	215.34 ± 55.95
Haptoglobin [mg/dl]	114.55 ± 27.13	113.10 ± 26.81	89.46 ± 47.44	86.45 ± 46.54	145.50 ± 49.87	143.83 ± 37.35

Mittelwert ± Standardabweichung. Signifikante Veränderungen ($p < 0.05$, Wilcoxon Rangsummentest) durch die Belastung sind fettgedruckt dargestellt. * markiert signifikante Veränderungen zwischen den Gruppen in Werten vor oder nach der Belastung (Kruskal-Wallis-Test). $n=6-10$

Die Mobilisierung von Leukozyten durch körperliche Belastung

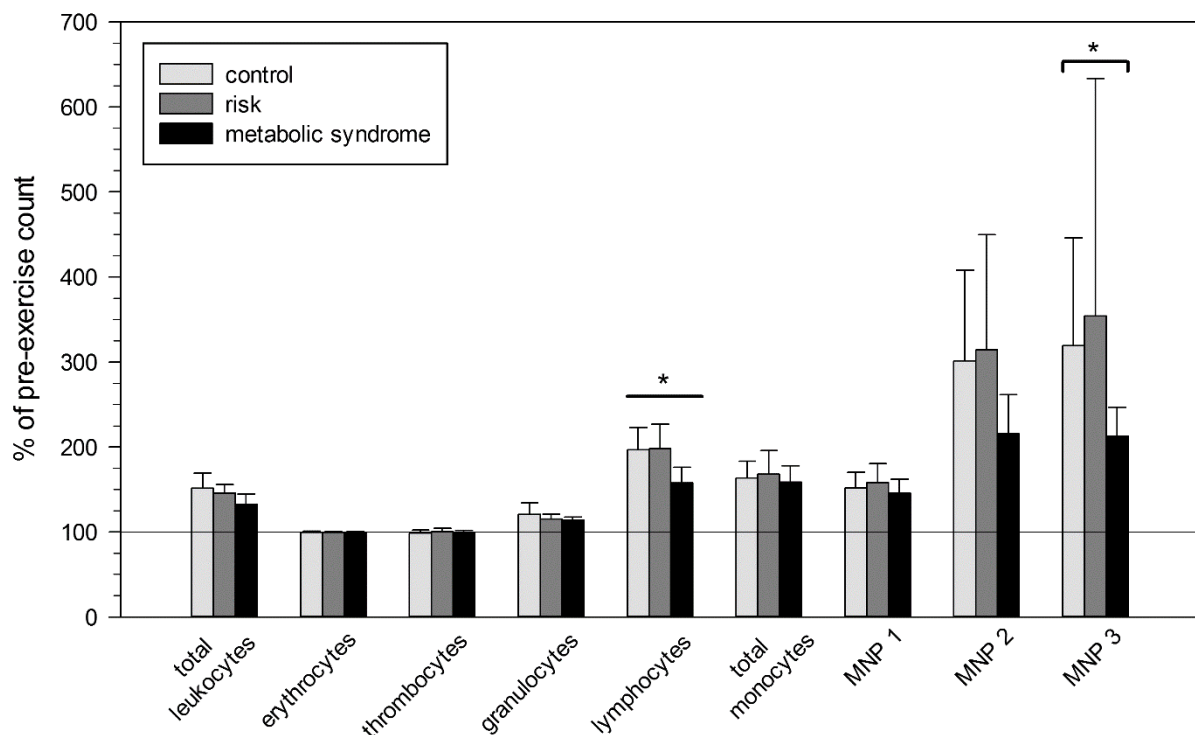
Die Ergometer Belastung führte zu einem signifikanten Anstieg der Zellzahlen von Leukozyten, Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und aller Monozyten Subpopulationen. In Abbildung 1 ist die prozentuale Veränderung der Zellzahlen nach der körperlichen Belastung im Vergleich zu den Werten davor dargestellt und Tabelle 2 enthält eine Auflistung der Vorher- und Nachher-Werte sowie des absoluten Unterschiedes.

Betrachtet man den Anstieg dieser Zellzahlen zwischen den Gruppen, so lassen sich unterschiedliche Anstiege der Lymphozytenzahlen feststellen, bei vergleichbaren Ausgangswerten. Bei Patienten mit Metabolischem Syndrom war der Anstieg der Lymphozyten signifikant kleiner.

Die proinflammatorischen Monozyten-Subpopulationen MNP2 und MNP3 zeigten den größten prozentualen Anstieg in allen drei Gruppen. Interessanterweise war der Anstieg dieser Zellen bei Patienten mit Metabolischem Syndrom deutlich geringer und bei den MNP3-Zellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe auch statistisch signifikant geringer (siehe Abbildung 1, $p=0,043$). Wenn man sich die absolute Veränderung der Zellkonzentrationen der CD14 CD16 positiven Monozyten anschaut (Tabelle 2, Δ), so wurden vergleichbare Zellzahlen mobilisiert, ohne signifikanten Unterschied.

Vor der körperlichen Belastung war das Verhältnis der MNP2 zu den MNP1 (MNP1/MNP2) Zellen signifikant verschieden zwischen den Gruppen ($p=0,026$) und verringerte sich signifikant bei allen drei Gruppen nach der körperlichen Belastung durch die relativ größere Mobilisierung der MNP2 Subpopulation. Die Ergometerbelastung führte in der Kontroll- und Risikogruppe zu einer ähnlichen Verteilung der Monozytensubpopulationen, wie sie bei den Probanden mit Metabolischem Syndrom bereits vorher vorhanden war. Das Verhältnis der MNP2 und MNP3 Populationen war zwischen den Gruppen nicht unterschiedlich und veränderte sich auch nicht nach der körperlichen Belastung.

Abbildung 1 Die Veränderung der Zellzahlen in den drei Studiengruppen



Die Zellzahlen wurden vor und nach einer Minute körperlicher Belastung bestimmt. Dargestellt sind die Prozentzahlen der Zellzahlen nach der Belastung im Vergleich zu vorher. Die Gesamtleukozytenzahl sowie die Zahlen aller Leukozyten Untergruppen stiegen signifikant an ($p < 0,05$). Der prozentuale Anstieg der Lymphozytenkonzentration war zwischen den Gruppen signifikant unterschiedlich und der prozentuale Anstieg der CD14dimCD16pos (MNP3) doppelt positiven Monozyten war signifikant unterschiedlich zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit Metabolischem Syndrom. MNP1: CD14brightCD16neg, MNP2: CD14brightCD16pos. * $p < 0,05$ n=5-10

Tabelle 2 Zellkonzentrationen vor und nach der körperlichen Belastung in den drei Studiengruppen

	Kontrollgruppe			Risikogruppe			MetS-Gruppe		
	vorher	nachher	Δ	vorher	nachher	Δ	vorher	nachher	Δ
Leukozyten [10 ³ /μl]	6,06 ± 1,38	9,13 ± 2,10	± 3,07 ± 1,05	5,49 ± 1,05	8,01 ± 1,64	± 2,51 ± 0,78	6,94 ± 2,07	9,07 ± 2,14	± 2,13 ± 0,42
Granulozyten [10 ³ /μl]	3,38 ± 0,79	4,03 ± 0,84	± 0,65 ± 0,32	3,23 ± 0,88	3,72 ± 0,97	± 0,49 ± 0,21	4,05 ± 1,50	4,58 ± 1,67	± 0,54 ± 0,20
Lymphozyten [10 ³ /μl]	2,18 ± 0,81	4,26 ± 1,59	± 2,09 ± 0,84	1,81 ± 0,60	3,52 ± 1,14	± 1,71 ± 0,66	2,34 ± 0,67	3,63 ± 0,89	± 1,29 ± 0,44
Monozyten [μl]	520 ± 110	840 ± 170	± 320 ± 100	470 ± 110	770 ± 160	± 300 ± 100	560 ± 190	860 ± 190	± 300 ± 60
MNP1 [μl]	472 ± 107	709 ± 143	± 237 ± 80	428 ± 110	668 ± 144	± 239 ± 79	517 ± 174	737 ± 183	± 219 ± 54
MNP2 [μl]	32 ± 10	92 ± 22	± 60 ± 22	24 ± 10	68 ± 20	± 44 ± 16	49 ± 13	103 ± 26	± 54 ± 19
MNP3 [μl]	12 ± 5	33 ± 13	± 22 ± 11	9 ± 4	26 ± 11	± 17 ± 9	20 ± 11	40 ± 17	± 20 ± 8

Mittelwerte ± Standardabweichung. Sämtliche Zellzahlen nach der Belastung sind signifikant unterschiedlich zu vorher (Wilcoxon Rangsummentest, p<0,05). n=6-10

Veränderungen im Protein- und Lipidgehalt von Granulozyten und Monozyten

Der Lipidgehalt in Granulozyten und Monozyten wurde vor sowie nach der Ergometerbelastung massenspektrometrisch bestimmt und der Proteingehalt wurde parallel dazu bestimmt.

Bei den Granulozyten konnte keine signifikante Änderung des Proteingehalts pro Zelle zwischen den Gruppen und durch die Belastung gesehen werden. Bei den isolierten Monozyten dagegen kam es zu einer signifikanten Verringerung des Proteingehalts in der Kontrollgruppe von 176μg/10⁶ Zellen ± 119 vor auf 116μg/10⁶ Zellen ± 62 (p=0,013) nach der Belastung. In der Risikogruppe verringerte sich der Proteingehalt von 131μg/10⁶ Zellen ± 45 auf 99μg/10⁶ Zellen ± 33 (p=0,018). In der Gruppe mit Metabolischem Syndrom war die Änderung des Proteingehalts von 124μg/10⁶ Zellen ± 198 auf 100μg/10⁶ Zellen ± 20 nicht signifikant. Der Proteingehalt von Monozyten der gesunden Kontrollen war vor der Belastung etwa gleich hoch wie bei den anderen zwei Gruppen nachher. Statistisch konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in den Proteingehalten zwischen den Gruppen vor bzw. nach der Belastung gezeigt werden.

Im Lipidgehalt der Granulozyten und Monozyten konnte keine Veränderung nachgewiesen werden. Obwohl besonders die Monozyten der Risiko- und

Metabolischen Syndrom Gruppe eine leichte Verringerung zeigten, ergab die statistische Auswertung keinen signifikanten Unterschied.

1.4. Diskussion

Hiermit wird die erste, wenn auch kleine Studie präsentiert, die den Effekt von intensiver körperlicher Belastung auf die Mobilisierung von Zellen und anderen Blutkomponenten in Patienten mit Metabolischem Syndrom untersucht. Um gleichzeitig die Durchführbarkeit des Versuchs und eine suffiziente Mobilisierung von Zellen zu gewährleisten, wurde die körperliche Belastung mit einer Leistung von 400W für eine Dauer von 60 Sekunden auf einem Fahrradergometer durchgeführt. Die Wirksamkeit dieses Protokolls Zellen zu mobilisieren wurde bereits vorher in anderen Arbeiten gezeigt [20, 25].

Obwohl einige Probanden den Versuch vorzeitig abbrechen mussten, wurde eine vergleichbare Belastung der Teilnehmer erreicht. Dies konnte durch die Bestimmung von Laktatwerten sowie der Herzfrequenz gezeigt werden. In einer Vorstudie konnten wir zusätzlich zeigen, dass ein Abbruch des Experiments keine negativen Auswirkungen auf die Mobilisierung der proinflammatorischen Monozyten hat. Interessanterweise erreichte die Metabolische Syndrom Gruppe eine höhere durchschnittliche Belastungszeit. Dies liegt wahrscheinlich an der geringeren Leistung bezogen auf das Körpergewicht, die von dieser Gruppe verrichtet werden musste. Bei vergleichbarer Belastung wurde somit auf eine Anpassung des Versuchsprotokolls an das Körpergewicht verzichtet.

Die Auswertung der Zellzahlen ergab einen signifikanten Anstieg der Leukozytenzahlen und aller analysierten Monozytensubpopulationen nach der körperlichen Belastung bei allen drei Gruppen. Ein ähnlicher Effekt wurde auch von Hong et al. [37] beobachtet, die den Effekt von moderater körperlicher Belastung bei Patienten mit Bluthochdruck untersuchten. Sie zeigten einen 1,5-fachen Anstieg von CD16 positiven Monozyten, konnten aber keinen signifikanten Unterschied zu gesunden Personen finden. Steppich et al. [20] fanden hingegen einen 2,1-fachen Anstieg dieser Zellen bei gesunden Teilnehmern nach einer Minute intensiver körperlicher Belastung bei 400 Watt. Hong et al. erklären diesen Unterschied damit, dass sie nur eine moderate 20-minütige körperliche Belastung auf dem Laufband benutzten. In unserer Studie konnten wir einen noch höheren Anstieg der CD14^{bright}CD16^{postiven} (MNP2) Monozyten feststellen. Leider ist ein direkter Vergleich mit den Daten von Hong et al. nicht möglich, da diese in ihrer Publikation keine absoluten Zahlen der Zellzahländerung ausweisen.

Des Weiteren konnten wir ein unterschiedliches Ausgangsniveau der Zellkonzentration von CD14^{bright}CD16^{postiven} Monozyten zwischen den Gruppen demonstrieren. Die Teilnehmer mit Metabolischem Syndrom hatten erhöhte Ruhewerte dieser Zellen im peripheren Blut und dadurch bedingt ein kleineres Verhältnis von MNP1 zu MNP2 Zellen. Unsere Daten bestätigen damit frühere Untersuchungen, die erhöhte Zahlen von CD16 positiven Monozyten bei fettleibigen Personen und Personen mit Hypertriglyzeridämie, Hypercholesterinämie, erhöhten LDL-Cholesterin-Werten oder erniedrigten HDL-Cholesterin-Werten feststellten [5, 13, 38]. Da diese Monozyten im Allgemeinen auch als proinflammatorische Monozyten bekannt sind [10], passt dies gut zu den grundsätzlich erhöhten Entzündungswerten bei Patienten mit Metabolischem Syndrom [39]. In der Kontroll- und Risikogruppe änderte sich das Verhältnis der MNP1 und MNP2 Zellen nach der körperlichen Belastung derart, dass es sich dem der Metabolischen Syndrom Gruppe vor der Belastung annäherte. Diese intensive körperliche Betätigung ist also in der Lage in gesunden Probanden eine Verteilung der Monozyten Populationen auszulösen, wie sie beim Metabolischen Syndrom permanent vorhanden ist.

Unsere Daten zeigen außerdem, dass sich die absolute Anzahl an mobilisierten CD16 positiven Zellen nicht zwischen den Gruppen unterscheidet. Obwohl die Patienten mit Metabolischem Syndrom schon erhöhte Ausgangswerte dieser Zellen haben, sind sie trotzdem in der Lage durch die intensive körperliche Aktivität kurzfristig die gleiche Anzahl an proinflammatorischen Monozyten zu mobilisieren, wie gesunde Personen. Wären diese dauerhaft erhöhten Ausgangswerte durch eine konstante Mobilisierung dieser Zellen aus dem Randstrom bedingt, wie von Steppich et al. vermutet [20], so würde man eine geringere Mobilisierung nach kurzer Belastung erwarten. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass die erhöhten basalen Zellzahlen am ehesten durch eine vermehrte Ausreifung dieser Zellen verursacht wird.

Es wurde bereits in der Vergangenheit beschrieben, dass die Lymphozytenzahlen nach einer Minute anstrengender körperlicher Tätigkeit ansteigen [18]. Wir konnten nahezu eine Verdoppelung der Zellzahlen von Lymphozyten nach der Ergometerbelastung in der Kontroll- und Risikogruppe feststellen. Bei den Personen mit Metabolischem Syndrom war der Anstieg signifikant kleiner. Diese Mobilisierung der Lymphozyten und ihrer Untergruppen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weitergehend untersucht, da der Schwerpunkt auf Monozyten und ihre

Subpopulationen gelegt wurde. Dennoch zeigt die aktuelle Forschung über den sog. Immunmetabolismus die Bedeutung des Immunsystems in der Stoffwechselregulation und in der Pathogenese von Typ 2 Diabetes und dem Metabolischen Syndrom auf [40].

Eine andere bemerkenswerte Veränderung, die wir nach der körperlichen Belastung beobachten konnten, ist die signifikante Verringerung des Proteingehalts von Monozyten bei Gesunden und Personen mit Risikoprofil und in geringerem Ausmaß auch bei den Patienten mit Metabolischem Syndrom. Im Gegensatz dazu war der Lipidgehalt von Monozyten nicht signifikant verändert. In Granulozyten ließ sich ebenso keine Veränderung von Protein- und Lipidgehalt pro Zelle feststellen. Es ist deshalb davon auszugehen, dass sich die mobilisierten Monozyten deutlich in ihrem Proteingehalt von den bereits im Blutkreislauf vorhandenen Monozyten unterscheiden müssen. Des Weiteren deuten der niedrigere basale Proteingehalt von Monozyten beim Metabolischen Syndrom zusammen mit den ähnlichen Werten nach der Belastung auf einen unterschiedlichen Proteingehalt zirkulierender Monozyten von Patienten mit Metabolischem Syndrom und Gesunden hin. Leider konnte im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit keine proteomische Analyse dieser Zellen durchgeführt werden.

Obwohl die vorliegende Arbeit durch die geringe Teilnehmerzahl und die bekannten hohen interindividuellen Unterschiede in den Effekten von körperlicher Belastung auf die Monozytenzahlen eingeschränkt ist, so konnten wir dennoch eine signifikante Mobilisierung von CD14 CD16 positiven Monozyten nach einer Minute intensiver körperlicher Betätigung feststellen. Probanden mit Metabolischem Syndrom hatten einen höheren basalen Anteil von proinflammatorischen Monozyten, wahrscheinlich aufgrund gesteigerter Reifung derselben. Die absolute Anzahl dieser Zellen, die durch den Versuch mobilisiert werden konnten unterschied sich nicht wesentlich zwischen den Gruppen.

Es stellt sich somit die Frage, ob die Mobilisierung von proinflammatorischen Monozyten vom Gefäßendothel einen Anteil an den positiven Effekten von körperlicher Aktivität auf die entzündliche Reaktion im Bereich des Gefäßendothels bei der Atherosklerose hat. Es wäre denkbar, dass eine intensive kurzzeitige körperliche Belastung, auch wenn sie dauerhaft nicht für eine Gewichtsreduktion und damit für positive Effekte auf den Stoffwechsel ausreicht, per se einen positiven Effekt auf die Entstehung von Gefäßplaques hat, indem sie proinflammatorische

Monozyten vom Endothel entfernt. Diese Hypothese kann wiederum nur in Langzeitstudien bestätigt werden.

1.5. Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
Apo	Apolipoprotein
ATP	<i>engl. Adult Treatment Panel</i>
BCA	<i>engl. Bicinchoninic acid assay</i>
BMI	<i>engl. Body mass index</i>
C	Komplement-Faktor <i>engl. Complement factor</i>
CD	Phänotypisches Oberflächenmerkmal, <i>engl. Cluster of differentiation</i>
CRP	C-reaktives Protein
EKG	Elektrokardiogramm
EDTA	Ethylenediamintetraessigsäure <i>engl. ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FcγR	Fc-gamma-Rezeptor
FITC	Fluorescein isothiocyanate
HDLc	Cholesterin mit Lipoprotein hoher Dichte <i>engl. high density lipoprotein cholesterol</i>
IL	Interleukin
LDLc	Cholesterin mit Lipoprotein niedriger Dichte <i>engl. low density lipoprotein cholesterol</i>
MNP	Monozytensubpopulation <i>engl. mononuclear phagocyte</i>
oxLDL	Oxidiertes LDL-Cholesterin
PC7	Phycoerythrin-Cyanin 7
W	Watt

1.6. Literaturverzeichnis

1. Eckel, R.H., S.M. Grundy, and P.Z. Zimmet, *The metabolic syndrome*. The Lancet, 2005. **365**(9468): p. 1415-1428.
2. Sutherland, J.P., B. McKinley, and R.H. Eckel, *The metabolic syndrome and inflammation*. Metabolic syndrome and related disorders, 2004. **2**(2): p. 82-104.
3. Fernandez-Real, J.M. and J.C. Pickup, *Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2008. **19**(1): p. 10-16.
4. Schmitz, G., A.S. Herr, and G. Rothe, *T-lymphocytes and monocytes in atherogenesis*. Herz, 1998. **23**(3): p. 168-177.
5. Rothe, G., et al., *Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 1996. **16**(12): p. 1437-1447.
6. Ziegler-Heitbrock, H., *Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14⁺ CD16⁺ subpopulation*. Immunology today, 1996. **17**(9): p. 424-428.
7. Szeberényi, J.B., et al., *Multi-color analysis of monocyte and dendritic cell precursor heterogeneity in whole blood*. Immunobiology, 2000. **202**(1): p. 51-58.
8. Schmitz, G. and M. Grandl, *Role of redox regulation and lipid rafts in macrophages during Ox-LDL-mediated foam cell formation*. Antioxidants & redox signaling, 2007. **9**(9): p. 1499-1518.
9. Kapinsky, M., et al., *Enzymatically degraded LDL preferentially binds to CD14^{high} CD16⁺ monocytes and induces foam cell formation mediated only in part by the class B scavenger-receptor CD36*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2001. **21**(6): p. 1004-1010.
10. Ziegler-Heitbrock, H., *The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation*. Journal of leukocyte biology, 2007. **81**(3): p. 584-592.
11. Schmitz, G., et al., *Scavenging, signalling and adhesion coupling in macrophages: implications for atherogenesis*. Current opinion in lipidology, 1997. **8**(5): p. 287-300.

12. Ziegler-Heitbrock, H., et al., *The novel subset of CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages*. European journal of immunology, 1993. **23**(9): p. 2053-2058.
13. Rothe, G., et al., *A more mature phenotype of blood mononuclear phagocytes is induced by fluvastatin treatment in hypercholesterolemic patients with coronary heart disease*. Atherosclerosis, 1999. **144**(1): p. 251-261.
14. Orsó, E., M. Grandl, and G. Schmitz, *Oxidized LDL-induced endolysosomal phospholipidosis and enzymatically modified LDL-induced foam cell formation determine specific lipid species modulation in human macrophages*. Chemistry and physics of lipids, 2011. **164**(6): p. 479-487.
15. Pulliam, L., B. Sun, and H. Rempel, *Invasive chronic inflammatory monocyte phenotype in subjects with high HIV-1 viral load*. Journal of neuroimmunology, 2004. **157**(1): p. 93-98.
16. Saleh, M., et al., *CD16⁺ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor*. Blood, 1995. **85**(10): p. 2910-2917.
17. Fingerle, G., et al., *The novel subset of CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes is expanded in sepsis patients*. Blood, 1993. **82**(10): p. 3170-3176.
18. Gabriel, H. and W. Kindermann, *The acute immune response to exercise: what does it mean?* International journal of sports medicine, 1997. **18**(1): p. S28.
19. Gabriel, H., et al., *Alterations of regular and mature monocytes are distinct, and dependent of intensity and duration of exercise*. European journal of applied physiology and occupational physiology, 1994. **69**(2): p. 179-181.
20. Steppich, B., et al., *Selective mobilization of CD14⁺ CD16⁺ monocytes by exercise*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2000. **279**(3): p. C578-C586.
21. Athens, J., et al., *Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects*. Journal of Clinical Investigation, 1961. **40**(6): p. 989.
22. Pabst, R., et al., *Evidence of a Selective Major Vascular Marginal Pool of Lymphocytes in the Lung*. Am Rev Respir Dis, 1987. **136**: p. 1213-1218.

23. Muller, W.A., *Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response*. Trends in immunology, 2003. **24**(6): p. 326-333.
24. Swirski, F.K., et al., *Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites*. Science, 2009. **325**(5940): p. 612-616.
25. Gabriel, H., A. Urhausen, and W. Kindermann, *Mobilization of circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations during and after short, anaerobic exercise*. European journal of applied physiology and occupational physiology, 1992. **65**(2): p. 164-170.
26. Ecker, J., et al., *Induction of fatty acid synthesis is a key requirement for phagocytic differentiation of human monocytes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(17): p. 7817-7822.
27. Leidl, K., et al., *Mass spectrometric analysis of lipid species of human circulating blood cells*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2008. **1781**(10): p. 655-664.
28. Liebisch, G., et al., *High throughput quantification of cholesterol and cholesteryl ester by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS)*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2006. **1761**(1): p. 121-128.
29. Liebisch, G., et al., *High-throughput quantification of lysophosphatidylcholine by electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Clinical chemistry, 2002. **48**(12): p. 2217-2224.
30. Liebisch, G., et al., *Quantitative measurement of different ceramide species from crude cellular extracts by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS)*. Journal of lipid research, 1999. **40**(8): p. 1539-1546.
31. Liebisch, G., et al., *High-throughput quantification of phosphatidylcholine and sphingomyelin by electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled with isotope correction algorithm*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2004. **1686**(1): p. 108-117.
32. Scherer, M., et al., *A rapid and quantitative LC-MS/MS method to profile sphingolipids*. J Lipid Res, 2010. **51**(7): p. 2001-11.
33. Scherer, M., G. Schmitz, and G. Liebisch, *High-throughput analysis of sphingosine 1-phosphate, sphinganine 1-phosphate, and lysophosphatidic*

- acid in plasma samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry.* Clinical chemistry, 2009. **55**(6): p. 1218-1222.
34. Scherer, M., G. Schmitz, and G. Liebisch, *Simultaneous Quantification of Cardiolipin, Bis (monoacylglycero) phosphate and their Precursors by Hydrophilic Interaction LC– MS/MS Including Correction of Isotopic Overlap.* Analytical chemistry, 2010. **82**(21): p. 8794-8799.
 35. Dill, D. and D.L. Costill, *Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration.* Journal of Applied Physiology, 1974. **37**(2): p. 247-248.
 36. Grundy, S.M., et al., *Diagnosis and management of the metabolic syndrome an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement.* Circulation, 2005. **112**(17): p. 2735-2752.
 37. Hong, S. and P.J. Mills, *Effects of an exercise challenge on mobilization and surface marker expression of monocyte subsets in individuals with normal vs. elevated blood pressure.* Brain Behav Immun, 2008. **22**(4): p. 590-9.
 38. Poitou, C., et al., *CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ Monocytes in Obesity and During Weight Loss Relationships With Fat Mass and Subclinical Atherosclerosis.* Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2011. **31**(10): p. 2322-2330.
 39. Hutley, L. and J.B. Prins, *Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome.* The American journal of the medical sciences, 2005. **330**(6): p. 280-289.
 40. Mathis, D. and S.E. Shoelson, *Immunometabolism: an emerging frontier.* Nature Reviews Immunology, 2011. **11**(2): p. 81-83.

2. Originalpublikation

Original Article

Effects of Acute Exercise on Monocyte Subpopulations in Metabolic Syndrome Patients

Ralph Wonner, Stefan Wallner, Evelyn Orsó, and Gerd Schmitz*

Institute for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University of Regensburg, Regensburg 93042, Germany

Objective: Acute exercise induces numerous changes in peripheral blood, e.g. counts of leukocytes. CD16^{pos} monocytes, which play a role in the pathogenesis of arteriosclerosis and the metabolic syndrome (MetS), are among the blood cells with the highest fold increase through exercise. So far no studies have investigated the effect of exercise on the blood cell composition of patients with MetS.

Approach and Results: Blood cell counts, a wide panel of laboratory tests, as well as lipid and protein content of monocytes and granulocytes were determined in healthy subjects, persons with metabolic risk and MetS patients before and after one minute of exercise at 400 W. Leukocyte counts increased significantly in all groups with CD14^{pos}CD16^{pos} monocytes showing the highest fold-change. In MetS patients the fold increase was smaller. They had a higher resting level of CD14^{pos}CD16^{pos} monocytes and a lower basal ratio of CD16^{neg}/CD16^{pos} monocytes. A similar ratio of these cells was induced in control and risk subjects after exercise. However, absolute counts of mobilized pro-inflammatory monocytes did not differ significantly. Furthermore, we detected a decrease in protein content of monocytes in controls, but not in MetS patients.

Conclusions: As strenuous exercise is able to mobilize the same amount of pro-inflammatory monocytes in MetS patients as in healthy persons, the elevated basal level of these cells in MetS patients is likely to be caused by enhanced maturation rather than chronic mobilization. The removal of these monocytes from the endothelium might be part of the beneficial effect of exercise on vascular disease.

© 2016 International Clinical Cytometry Society

Key terms: exercise; metabolic syndrome; monocytes; monocyte subpopulations; flow cytometry; protein

How to cite this article: Wonner R, Wallner S, Orsó E and Schmitz G. Effects of Acute Exercise on Monocyte Subpopulations in Metabolic Syndrome Patients. Cytometry Part B 2016; 00B: 000–000.

Metabolic syndrome (MetS) is a complex metabolic disorder characterized by abdominal obesity, dyslipidemia, hypertension, and insulin resistance (1). It represents a primary risk factor for cardiovascular disease that is associated with chronic low grade inflammation (2), i.e., elevated serum levels of pro-inflammatory parameters such as CRP, TNF- α , and IL6 (3–6).

Monocytes play an important role in innate immunity and are involved in metabolic regulation (7) (Immunometabolism) (8) and the formation of atherosclerotic plaques (9). Monocytes can be subdivided according to their expression of the Fc-gamma-receptor (Fc γ R) III (CD16), and the lipopolysaccharide receptor (CD14). As established previously, the monocyte population consists of multiple subpopulations including CD14^{bright}CD16^{neg}, CD14^{bright}CD16^{pos}, and CD14^{dim}CD16^{pos} mono-

cytes, referred to as mononuclear phagocyte subpopulation (MNP) 1, MNP2, and MNP3 (10–12). CD14^{pos}CD16^{pos} monocytes, hence MNP2 and MNP3, are generally referred to as pro-inflammatory monocytes (11).

*Correspondence to: Gerd Schmitz, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universität Regensburg, D-93042 Regensburg, Germany. E-mail: gerd.schmitz@ukr.de
Grant sponsor: European Community's Seventh Framework Programme; Grant number: FP7/2007–2013.

Grant sponsor: IP-Project LipidomicNet; Grant number: n° 202272.

Received 13 January 2016; Revised 3 March 2016; Accepted 6 June 2016

Published online 00 Month 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/cyto.b.21387

A special role in atherosclerosis has been attributed to these cells because they possess the ability to take up large amounts of lipids transforming them into a so called foam cell phenotype (13,14). They have also been shown to exhibit cell surface proteins that differ from those of CD16^{neg} monocytes (10,15,16) and to be more mature (11) with MNP3 being the most terminally differentiated phenotype (10,17). Monocyte subsets do not only differ in the expression of CD16 (FcγRIII), but also in their expression of the other two Fcγ receptors. FcγRI (CD64) is the predominant Fcγ- receptor on MNP1 cells, whereas the level of expression of FcγRII (CD32) was found highest on MNP2 cells (14,18).

The FcγRII (CD32), as well as other opsonin receptors, such as complement receptors and the Fcμ/IgM receptor, previously named TOSO/FAIM3 (19), play the major role in recognition and phagocytosis of eLDL (enzymatically modified low density lipoprotein) particles, that are potent inducers of foam cell formation (20). Clinically, an increased fraction of CD16^{pos} monocytes was detected in subjects with high levels of inflammation (15), e.g. patients suffering of AIDS (21), cancer (22), and sepsis (23,24). Besides, the population size of CD14^{dim}CD16^{pos} monocytes is negatively correlated to HDLc levels (10) and positively correlated to triglycerides, total cholesterol (18), and to the Apo E4 allele (10), suggesting that these metabolic conditions, as well as chronic states of inflammation lead to accelerated maturation of monocytes into the CD14^{dim}CD16^{pos} subset (18).

Acute strenuous exercise is known to exert a potent effect on the counts of peripheral blood cells. Leukocyte counts increase significantly after exercise and the extent of this increase is dependent on cell type and exercise intensity (25–27). Especially the CD14^{pos}CD16^{pos} subpopulation of monocytes was found to be mobilized to a relatively high degree (up to 4.8-fold) (25,28,29). These cells are thought to be at least in part mobilized from the marginal pool of the blood stream (30,31), a blood compartment that contains cells, that adhere loosely to or roll on vascular endothelium by interaction of cell surface molecules, such as selectins, integrins, etc. (32). Recruitment of cells into the blood stream through physical stress is considered to be caused by shear stress and might be mediated by catecholamines (33). Additionally, Swirski et al. demonstrated the mobilization of monocytes from a splenic reservoir (34).

The increase of pro-inflammatory monocytes in the conditions aforementioned could not only be because of a higher rate of maturation but also a shift of these cells from the marginal to the central pool of the blood, as suggested by Steppich et al. (29).

Currently no data is available on the distribution of monocyte subpopulations in MetS patients and the mobilization of these cells in an exercise model. It is unknown whether the chronically elevated count of pro-inflammatory monocytes in the MetS can be further elevated by acute exercise as has been shown in healthy persons. In the present study, we therefore analyzed the effects of an acute strenuous exercise intervention on

cell numbers, especially on pro-inflammatory CD14^{pos}CD16^{pos} monocytes in MetS patients in contrast to healthy subjects and those at risk for the MetS. Furthermore, the effects on the lipid and protein content of cells as well as on a selection of routine parameters were examined.

MATERIALS AND METHODS

Recruitment of Subjects, Cycling Exercise Protocol

Ethical approval of the study protocol was obtained from the hospital ethics committee (Universitätsklinikum Regensburg, Ethikkommission der medizinischen Fakultät, proposal 08/119) and healthy volunteers between 18 and 60 years were recruited amongst hospital staff.

Exclusion criteria for the study comprised coronary artery disease, orthopedic problems, and any other conditions that would endanger the subjects while undergoing strenuous exercise. Acute infection was ruled out clinically prior to the experiment and confirmed by lab testing. All experiments were performed in the morning. Study subjects were asked to be fasting for at least 8 h and refrain from any physical exercise for at least 12 h prior to the experiment. After thorough explanation of risks of the experiment, written informed consent was obtained and height, weight, abdominal circumference at umbilical level and blood pressure were measured.

For defined physical exertion an Ergo-Fit Cycle 407 med bicycle ergometer (Ergo-Fit, Germany) was used with a protocol based on study protocols by Steppich et al. (29) and Gabriel et al. (26). Exercise started with a short warm up at 100 W for several seconds, was then continuously raised to 400 W in no longer than 5 s and maintained at this level for 60 s or until exhaustion. ECG, heart rate and pedaling rate were monitored throughout the exercise. Blood samples were taken by venipuncture immediately before and within 60 s after exercising, collected in serum and EDTA Monovettes (Sarstedt, Germany) and processed within 1 h.

Routine Laboratory Parameters

Several routine lab parameters were assessed before and after cycling exercise. Primarily parameters of inflammation and lipid metabolism were selected, as they play an essential part in the pathogenesis of the MetS.

Total protein, albumin, total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein cholesterol (HDLc), low-density lipoprotein cholesterol (LDLc), the small subfraction of HDLc (HDL₃), apolipoprotein (Apo) A-1, Apo B-100, C-reactive protein (CRP), complement factor 3c (C3c), and 4 (C4), glucose, and free hemoglobin levels were measured in serum samples on a Dimension Vista 1500 system (Siemens Healthcare, Germany). Lactate levels were determined in sodium-fluoride containing blood samples on the Dimension Vista 1500. The large particle subfraction of HDL-cholesterol (HDL₂) was calculated using total HDLc and HDL₃ levels.

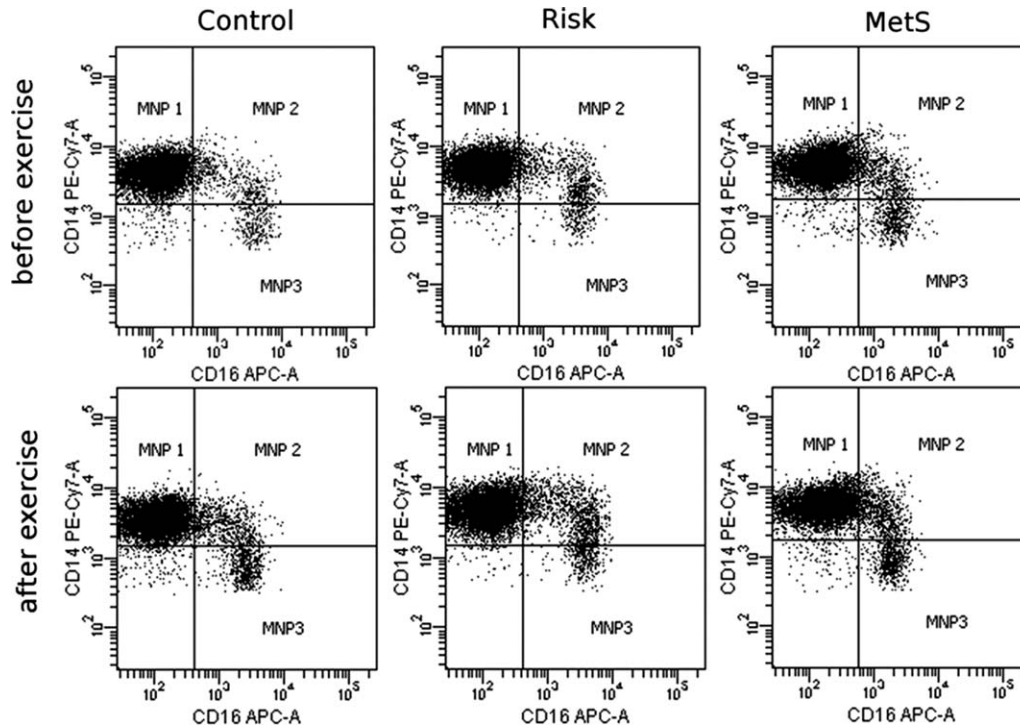


FIG. 1. Representative dotplots of monocyte populations in the study groups before and after exercise. Flow cytometric analysis of monocyte subsets was performed for the three study groups (control, risk, and metabolic syndrome) before and after one minute of exercise at 400 W. Monocytes were subdivided using the CD14 and CD16 surface antigen into CD14^{bright}CD16^{neg} (MNP1), CD14^{bright}CD16^{pos} (MNP2), and CD14^{dim}CD16^{pos} (MNP3) monocytes and their percentages of total monocyte population was calculated.

Commercial ELISA Kits were used for measuring serum concentrations of oxidized LDLc (oxLDL) (Merckodia, Sweden), Apo B-48 (Shibayagi, Japan), Apo C-2 and Apo C-3 (both from AssayPro, USA). Apo E levels were determined on a BN proSpec II analyzer (Siemens Healthcare) and IL-6 on a Cobas e411 analyzer (Roche diagnostics, Switzerland), both from serum samples.

Cell Count Analysis

A Sysmex XE-5000 hematology analyzer (Sysmex, Japan) was used to determine leukocyte, lymphocyte, granulocyte, monocyte, erythrocyte, and platelet counts in EDTA-blood samples.

Identification of Monocyte Subsets by Flow Cytometry

Monoclonal Antibodies: The following antibodies were used in this experiment: PerCP-conjugated anti-CD45 clone 2D1 (No. 345809, isotype mouse IgG₁, κ , Becton Dickinson, Germany), APC-conjugated anti-CD16 clone 3G8 (No. MHCD1605, isotype mouse IgG₁, Caltag Laboratories, UK), PC7-conjugated anti-CD14 clone M5E2 (No. 557742, isotype mouse IgG_{2a}, κ , Becton Dickinson, Germany), PE-conjugated anti-CD11c clone S-HCL-3 (No. 333149, isotype mouse IgG_{2b}, κ , Becton Dickinson, Germany), FITC-conjugated anti-CD62L clone DREG56 (No. IM1231U, isotype mouse IgG₁, IOTest, Beckman Coulter, Germany).

Staining Procedure: In brief 100 μ l of EDTA-whole blood were incubated on ice for 15 min with 5 μ l anti-CD16, 5 μ l anti-CD14, 10 μ l anti-CD45, 20 μ l anti CD62L,

and 20 μ l anti-CD11c, followed by erythrocyte lysis with 3 ml of FACSlysis (No. 349202, Becton Dickinson, Germany). Specimens were then incubated in the dark for 10 min at room temperature with mixing in between. After two cycles of washing with 3.5 ml PBS, stained cells were measured immediately on a BD Canto II flow cytometer (Becton Dickinson, Germany). Data was analyzed using FACS DIVA 6.1.3 software (Becton Dickinson, Germany).

Gating Strategy: Leukocytes were identified by gating all CD45⁺ cells in the CD45-SSC dot-plot. Scatter Gates were then set around monocytes in the CD14-SSC dot-plot by isolating the CD14⁺ and SSC^{dim} population and a total of 10,000 events was measured.

Percentages of CD14^{bright}CD16^{neg} (MNP 1), CD14^{bright}CD16^{pos} (MNP 2), and CD14^{dim}CD16^{pos} (MNP 3) monocytes were then determined using a two-color dot plot and the rectangular gating strategy proposed by Zawada et al. (35) (Fig. 1).

Determination of absolute cell counts: The absolute number of cell populations was calculated using total monocyte count results from a Sysmex cell counter (Sysmex, Germany).

MiFlowCyt: Experimental details have been made accessible at "flowrepository.org" under the following repository ID: FR-FCM-ZZML.

Lipid Analysis

For the targeted lipid analysis granulocytes and monocytes were separated off whole blood samples using

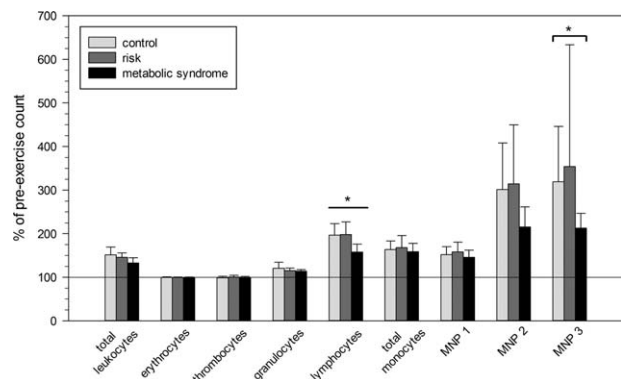


FIG. 2. Change in cell counts for the three study groups. Cell counts were determined before and after one minute of extensive exercise. Given are the percentages of cell counts after exercise compared to pre-exercise levels. Total leukocyte counts and all leukocyte subset counts increased significantly ($P < 0.05$) through exercise. Percentage increase of lymphocytes was significantly different between the three study groups and percentage increase of CD14dimCD16pos (MNP3) double positive monocytes was significantly different between control and metabolic syndrome subjects. MNP1: CD14brightCD16neg, MNP2: CD14brightCD16pos. * $P < 0.05$, $n = 5-10$.

magnetic bead cell separation on an automated auto-MACS Pro Separator (Miltenyi Biotec, Germany). Isolation of cells was performed in two cycles. Magnetic bead conjugated CD15 antibodies were used for positive selection of granulocytes and CD14 antibodies (both Miltenyi Biotec) for subsequent positive selection of monocytes. Staining of cells was performed according to manufacturer's instructions, except for utilization of the CD15^{neg} fraction from the first separation cycle in the second cycle to minimize use of whole blood. The counts of granulocytes and monocytes obtained per microliter of running buffer were determined in the Sysmex cell analyzer.

After centrifugation and removal of excess running buffer, cell pellets were lysed in 0.1% SDS, sonified, and protein content was determined using a BCA assay (Uptima-Interchim, France).

Lipid extraction from aliquots corresponding to 100 μ g of protein and subsequent mass spectrometry in the presence of not naturally occurring lipid species as internal standards were conducted as explained in previous publications (36-44). Measured lipid species included phosphatidylcholine, sphingomyelin, phosphatidylethanolamine, phosphatidylethanolamine-based plasmalogens, phosphatidylserine, phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol, lysophosphatidylcholine, ceramide, cholesterol esters, and free cholesterol. Lipid content was determined in nmol per mg protein and lipid content per million cells was calculated based on cell counts obtained after cell separation.

Calculation of Volume Changes

All results obtained after exercise were adjusted for plasma or blood volume changes according to the method published by Dill et al. (45). In brief, blood volume after exercise was calculated using the relative

change in hemoglobin concentration and plasma volume was subsequently estimated by use of the hematocrit after exercise.

Stratification of Study Groups

Participants were subdivided into three study groups (control, risk, MetS) according to the ATP III criteria for the MetS (46). MetS was defined as the presence of three or more of the following clinical criteria: blood pressure $\geq 130/85$ mm Hg or treatment, waist circumference ≥ 102 cm in men and ≥ 88 cm in women, HDLc ≤ 40 mg/dl in men and ≤ 50 mg/dl in women, triglycerides ≥ 150 mg/dl, and fasting plasma glucose levels ≥ 100 mg/dl or treatment.

If subjects met only one or two of the criteria, they were classified as risk for MetS and if none of the criteria were present, subjects were grouped as controls.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 20.0. Differences between all three groups in pre-exercise parameters were tested by a Kruskal-Wallis test and checked individually *post hoc* using a Mann-Whitney *U* test (Fig. 2). No correction for multiple testing was applied. A Wilcoxon signed rank test for paired data was used to identify significant changes before and after exercise (Figs. 2 and 3). For nominal variables the χ^2 test was employed. All data is presented as means \pm standard deviation unless otherwise stated. Statistical significance was defined as $P < 0.05$.

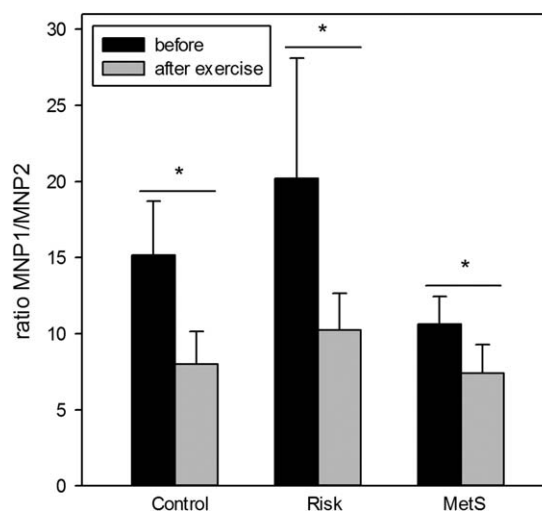


FIG. 3. Ratio of MNP1 and MNP 2 cells before and after exercise depending on study group. After 60 s of acute exercise at 400 W, the ratio of CD14posCD16neg (MNP1) and CD14brightCD16pos (MNP2) monocytes (MNP1/MNP2) decreased significantly in control, risk, and metabolic syndrome (MetS) subjects. Ratios before exercise were significantly different among the study groups with the lowest basal ratio being present in MetS patients and similar ratios reached by controls and risk subjects through exercise. * $P < 0.05$, $n = 5-8$.

Table 1
Subject Demographics

	Control (n = 10)	Risk (n = 7)	Metabolic syndrome (n = 6)	P-values
Sex, male/female	4/6	3/4	4/2	0.558
Age	34 ± 10	48 ± 5	43 ± 6	0.007
Height (m)	1.70 ± 0.09	1.70 ± 0.07	1.76 ± 0.10	0.527
Weight (kg)	63.2 ± 7.2	74.1 ± 13.6	106 ± 20.5	0.001
BMI (kg/m ²)	21.7 ± 1.5	25.4 ± 3.3	34.4 ± 6.1	0.001
Waist circumference (cm)	73.4 ± 6.3	85.1 ± 12.1	110.8 ± 14.1	0.001
HDL-cholesterol (mg/dl)	73.0 ± 14.2	65.0 ± 13.1	35.0 ± 11.7	0.002
Triglycerides (mg/dl)	109.3 ± 25.3	118.1 ± 52.7	565.5 ± 815.3	0.080
Blood pressure systolic (mm Hg)	120 ± 7	134 ± 6	146 ± 16	0.001
Blood pressure diastolic (mm Hg)	79 ± 10	89 ± 9	97 ± 9	0.012
Fasting glucose (mg/dl)	83.7 ± 10.9	90.3 ± 6.2	120.8 ± 64.2	0.017

Data presented as mean ± SD. *P*-values for significant differences among groups were calculated using the χ^2 test for sex distribution and the Kruskal–Wallis test for metric data.

RESULTS

Patient Demographics

In total 23 participants were recruited and divided into three groups according to the ATP III criteria for the MetS (46). Six volunteers met all the criteria and were categorized as MetS. Seven participants did not fulfil all criteria and were therefore classified as the risk group and the remaining 10 healthy subjects were assigned to the control group. Table 1 depicts participants' demographics with regard to subject stratification. Groups showed statistically significant differences in blood pressure, body weight, BMI, waist circumference, levels of HDLc, and fasting glucose, as well as in age. Controls were significantly younger than risk and MetS subjects.

Exercise Characteristics

The characteristics of the physical exercise intervention are presented in Table 2. In all three groups lactate levels were massively elevated as compared to the lab internal reference range (3.6–18.2 mg/dl). Increased lactate is indicative of anaerobic exercise and correlates well with the level of exhaustion reached by the study subject. Therefore, comparable lactate levels and heart rates after exercise reflect equivalent levels of physical exertion among groups. Exercise times were different, although not significantly, due to eight subjects (two in the control, four in the risk, and two in the MetS group) that had to quit early because of physical exhaustion. Furthermore, we could demonstrate in a pilot study

with 25 random volunteers that the mobilization of CD14^{pos}CD16^{pos} double positive monocytes does not differ significantly between subjects that complete one minute of intensive exercise and those who quit early due to exhaustion (data not shown).

Changes in Lipid Levels and Inflammation Related Serum Parameters

Routine lab testing for lipid and inflammatory parameters was performed before and after the exercise intervention for all participants (Table 3). Significant changes through exercise were observed for HDL₂ (*P* = 0.028), HDL₃ (*P* = 0.028), C3c (*P* = 0.037), and C4 (*P* = 0.005) in control subjects and for HDLc (*P* = 0.018), LDLc (*P* = 0.028), HDL₃ (*P* = 0.018), Apo-AI (*P* = 0.043), C3c (*P* = 0.028), and C4 (*P* = 0.027) in the risk group. No parameters were significantly altered in the MetS group.

In an intergroup comparison before exercise, levels of ApoB100 (*P* = 0.016), C4 (*P* = 0.006), and oxLDL (*P* = 0.035) and after exercise, levels of ApoB100 (*P* = 0.023), C3c (*P* = 0.016), C4 (*P* = 0.029), and oxLDL (*P* = 0.035) were significantly different.

Exercise is Able to Mobilize Leukocytes to the Circulation

Compared to pre-exercise levels all three study populations exhibited significant increases in the counts of leukocytes, granulocytes, lymphocytes, monocytes, and monocyte subpopulations (Fig. 2, Table 4).

In the intergroup comparison of the three study populations we also found significant differences in the degree of lymphocyte mobilization depending on the

Table 2
Exercise Characteristics

	Control	Risk	Metabolic syndrome	P-values
Exercise time (s)	55.8 ± 8.9	49 ± 12.4	56.7 ± 5.2	0.279
Lactate after exercise (mg/dl)	80 ± 20.7	64.4 ± 16.7	71.6 ± 18.4	0.265
Heart rate after exercise (bpm)	160 ± 151	150 ± 15.58	155 ± 8.57	0.511
Plasma volume changes (% of pre-exercise volume)	92 ± 3.9	90.8 ± 2.42	93.8 ± 2.8	0.260

Data presented as mean ± SD. *P*-values for significant differences among groups were calculated using the Kruskal–Wallis test.

Table 3
Values of Routine Lab Parameters Before and After Exercise Depending on Study Group

	Control		Risk		Metabolic Syndrome	
	Before	After	Before	After	Before	After
Protein (g/l)	74.1 ± 2.9	73.7 ± 3.4	73.6 ± 3.6	71.9 ± 3.4	75.2 ± 5.1	75.2 ± 4.3
Albumin (g/l)	41.5 ± 3.5	40.7 ± 3.7	40.9 ± 1.9	40.3 ± 1.8	40.7 ± 1.9	40 ± 1.6
Cholesterol (mg/dl)	192 ± 33.4	190 ± 33.3	217 ± 36.1	211 ± 34.4	205 ± 39.8	204 ± 36.6
Triglycerides (mg/dl)	109 ± 25.3	106 ± 25.6	118 ± 52.6	113 ± 51.1	566 ± 815	545 ± 777
HDLc (mg/dl)	73 ± 14.2	72.6 ± 13.7	65 ± 13.1	63.3 ± 12.8	35 ± 11.7	35 ± 12.8
LDLc (mg/dl)	104 ± 24	103 ± 24.7	136 ± 29.6	131 ± 29.4	106 ± 27.4	106 ± 29
HDL2 (mg/dl)	24 ± 7.5	26.2 ± 8.4	27.3 ± 14.1	24 ± 7	8.7 ± 4.6	9.4 ± 6
HDL3 (mg/dl)	49 ± 7.6	46.5 ± 6.7	42 ± 5.9	39.3 ± 6.1	26.3 ± 7.4	25.7 ± 7.1
oxLDL	42.5 ± 13.2 ^a	44.2 ± 12.3 ^a	71.9 ± 26.8 ^a	62.5 ± 18.7 ^a	63.2 ± 20.8 ^a	67.9 ± 8.6 ^a
Apo A-I (mg/dl)	197 ± 30.9	195 ± 30.1	178 ± 25	172 ± 21.1	136 ± 12.6	140 ± 16.1
Apo B-100 (mg/dl)	84.2 ± 16.2 ^a	84.3 ± 16.8 ^a	106 ± 16.7 ^a	103 ± 16.5 ^a	108 ± 18.4 ^a	108 ± 15.1 ^a
Apo B-48 (μg/ml)	9.2 ± 5.96	9.37 ± 6	5.64 ± 2.89	5.47 ± 3.12	37.1 ± 54.4	39.7 ± 63.5
Apo C-II (mg/dl)	4.72 ± 1.53	4.92 ± 1.63	5.53 ± 2.07	5.38 ± 1.51	11.7 ± 11.6	14.1 ± 13.2
Apo C-III (mg/dl)	14.8 ± 4.3	14.5 ± 3.4	15.4 ± 5.7	15.7 ± 4.7	30.3 ± 28.2	35.3 ± 29.3
Apo E (mg/dl)	3.50 ± 0.5	3.54 ± 0.54	3.87 ± 0.88	3.77 ± 0.86	7.7 ± 8.67	7.72 ± 8.09
IL-6 (pg/ml)	2 ± 0	2.04 ± 0.12	2 ± 0	2.02 ± 0.05	3.02 ± 2.46	3.1 ± 2.04
CRP (mg/l)	3.13 ± 0.53	3.22 ± 0.71	3.1 ± 0.53	3.09 ± 0.51	3.05 ± 0.37	3.08 ± 0.43
C3c (mg/dl)	111 ± 12.3	105 ± 15.3^a	115 ± 6.8	112 ± 7.6^a	135 ± 24.3	137 ± 22.1 ^a
C4 (mg/dl)	19.4 ± 4.2 ^a	22.3 ± 7.2^a	24.1 ± 2.8 ^a	25.8 ± 3.1^a	29.6 ± 7.4 ^a	31.3 ± 8.1 ^a
Free hemoglobin (mg/l)	218 ± 113	231 ± 92.5	150 ± 43.3	174 ± 57.1	236 ± 82.5	215 ± 56
Haptoglobin (mg/dl)	115 ± 27.1	113 ± 26.8	89 ± 47.4	86.5 ± 46.5	146 ± 49.9	144 ± 37.4

Data presented as mean ± SD. Bold letters mark significantly different ($P < 0.05$) results after exercise compared to pre-exercise levels (Wilcoxon signed rank test).

^aMarks significantly different levels in before or after levels between the study groups (Kruskal–Wallis test). $n = 6$ –10.

metabolic status of the study subjects ($P = 0.013$). While in controls lymphocyte counts increased from $2.18/\mu\text{l} \pm 0.81$ to $4.26/\mu\text{l} \pm 1.59$, (representing a fold change of 1.97 ± 0.26) and in risk subjects to a similar extent from $1.81/\mu\text{l} \pm 0.60$ to $3.52/\mu\text{l} \pm 1.14$ (a fold change of 1.98 ± 0.29), MetS subjects showed a smaller increase from $2.34/\mu\text{l} \pm 0.67$ to $3.63/\mu\text{l} \pm 0.89$, equaling a fold change of 1.57 ± 0.18 . Lymphocyte counts before and after exercise did not differ significantly between groups.

Exercise was able to induce significant increases for the CD16^{pos} subpopulations MNP2 and MNP3 in all three metabolic study groups. Representative dot-plots before and after exercise are shown in Figure 1. Fold changes of CD16^{pos} positive monocytes through exercise were as follows, for MNP2 cells: control: 3.01 ± 1.07 , risk: 3.14 ± 1.35 , MetS: 2.15 ± 0.46 and for MNP3 cells: control: 3.19 ± 1.21 , risk: 3.54 ± 2.80 , MetS: 2.13 ± 0.34 .

Interestingly this exercise induced increase of cell counts for CD14^{pos}CD16^{pos} monocytes was notably lower in the MetS group, reaching statistical significance for MNP3 cells ($P = 0.043$, Fig. 2). Looking at absolute numbers of mobilized CD14^{dim}CD16^{pos} and CD14^{bright}CD16^{pos} monocytes (see Table 4), similar cell numbers were mobilized, without statistically significant differences. Statistical analysis of the pre-exercise levels of the other blood cell types also did not yield any significant differences.

Before exercise the MNP1 to MNP2 ratio as an indicator for the proportion of CD16^{neg} classical to CD16^{pos} proinflammatory monocytes was significantly different

($P = 0.026$) between study groups and decreased significantly through exercise among all three groups due to the relatively higher mobilization of MNP2 cells (Fig. 3). Remarkably MetS subjects already showed a MNP1/MNP2 ratio before exercise that was similar to the ratio of these cells after exercise in the control and risk group. The ratio of MNP3 to MNP2 cells was not different between groups and was not influenced by exercise.

Changes in Protein and Lipid Content of Granulocytes and Monocytes

Mass spectrometric lipid analysis was performed in granulocytes and monocytes before and after exercise and total protein content was quantified in parallel.

Figure 4 (top panels) illustrates the total protein content per million cells for granulocytes and monocytes depending on the study group. Granulocytes exhibited no significant changes in protein content after exercise or between groups. In contrast exercise induced a significant decrease in protein content in isolated monocytes from $176 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells} \pm 119$ before exercise to $116 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells} \pm 62$ ($P = 0.013$) afterwards in the control group. In the risk group monocyte protein content decreased significantly from $131 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells} \pm 45$ to $99 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells} \pm 33$ ($P = 0.018$). In the MetS group the change in protein content from $124 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells} \pm 198$ to $100 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells} \pm 20$ was not statistically significant ($P = 0.173$). Control subjects showed a mean cellular protein content after exercise similar to the other two groups before exercise. However, statistical analysis did not exhibit any significant differences in before- and

Table 4
Cell Numbers Per Microliter Before and After Exercise in the Three Groups

	Control			Risk			Metabolic Syndrome		
	Before	After	Delta	Before	After	Delta	Before	After	Delta
Leukocytes ($10^3/\mu\text{l}$)	6.06 \pm 1.38	9.13 \pm 2.10	3.07 \pm 1.05	5.49 \pm 1.05	8.01 \pm 1.64	2.51 \pm 0.78	6.94 \pm 2.07	9.07 \pm 2.14	2.13 \pm 0.42
Granulocytes ($10^3/\mu\text{l}$)	3.38 \pm 0.79	4.03 \pm 0.84	0.65 \pm 0.32	3.23 \pm 0.88	3.72 \pm 0.97	0.49 \pm 0.21	4.05 \pm 1.50	4.58 \pm 1.67	0.54 \pm 0.20
Lymphocytes ($10^3/\mu\text{l}$)	2.18 \pm 0.81	4.26 \pm 1.59	2.09 \pm 0.84	1.81 \pm 0.60	3.52 \pm 1.14	1.71 \pm 0.66	2.34 \pm 0.67	3.63 \pm 0.89	1.29 \pm 0.44
Monocytes (μl)	520 \pm 110	840 \pm 170	320 \pm 100	470 \pm 110	770 \pm 160	300 \pm 100	560 \pm 190	860 \pm 190	300 \pm 60
MNP1 (μl)	472 \pm 107	709 \pm 143	237 \pm 80	428 \pm 110	668 \pm 144	239 \pm 79	517 \pm 174	737 \pm 183	219 \pm 54
MNP2 (μl)	32 \pm 10	92 \pm 22	60 \pm 22	24 \pm 10	68 \pm 20	44 \pm 16	49 \pm 13	103 \pm 26	54 \pm 19
MNP3 (μl)	12 \pm 5	33 \pm 13	22 \pm 11	9 \pm 4	26 \pm 11	17 \pm 9	20 \pm 11	40 \pm 17	20 \pm 8

Data presented as mean \pm SD. All after exercise counts are significantly different to before exercise counts (Wilcoxon signed rank test), $P < 0.05$. $n = 6-10$.

after-levels of protein content between the study groups.

No similar effect was detectable in the total lipid content of granulocytes and monocytes (Fig. 4, bottom panels). Although monocytes show a trend towards decreased total lipid content, especially in the risk and MetS group these changes did not reach statistical significance.

DISCUSSION

We hereby present the first, albeit still small study investigating the effect of an exercise intervention on the mobilization of immune cells and soluble blood components in MetS patients.

To ensure the feasibility of the experiment and to obtain a sufficient mobilization of cells at the same time, we utilized a short high-intensity protocol with 60 s of bicycle exercise at a workload of 400 W. The effectiveness of this approach to mobilize cells in healthy individuals was established previously (26,29).

Strongly elevated lactate levels after exercise indicated that the exercise was anaerobic. Although exercising time differed slightly albeit not significantly between groups due to eight subjects (two in the control, four in the risk, and two in the MetS group) having quit prematurely, comparable lactate levels and heart rates after exercise were reached. In a pilot study, we could furthermore demonstrate with 25 random volunteers that the mobilization of CD14/CD16 double positive monocytes did not differ significantly between subjects that completed 1 min of exercise and those who had to quit early due to exhaustion. Interestingly, MetS patients reached a higher mean exercising time than the other two groups. The reason is probably a lower power ratio (Watt per kg body weight) due to the higher body weight. We therefore achieved a comparable level of physical strain for all participants without further adjustment of the protocol for body weight.

Statistical analysis yielded a significantly different mean age between our study groups. We did not consider age to confound our results since previous studies could show that the distribution of monocyte subpopulations is not dependent on patient age (47).

Analysis of cell counts showed a significant increase in leukocyte counts and all analyzed monocyte subsets in all our study groups after exercise. Hong et al. (48) observed a similar effect of moderate exercise on the counts of CD16^{pos} monocytes in subjects with hypertension. They demonstrated a 1.5-fold mean increase in CD14/CD16 double positive monocytes but could not find a statistical difference between subject groups. Steppich et al. (29) on the other hand had previously shown a higher induction of CD16^{pos} monocytes (2.1-fold compared to pre-exercise levels) in healthy subjects after 1 min of exercise at 400 W. Hong et al. explained this difference by the moderate 20 min treadmill intervention they used in contrast to the high intensity exercise of Steppich et al. In our study, we detected an even larger increase of CD14^{bright}CD16^{pos} monocytes.

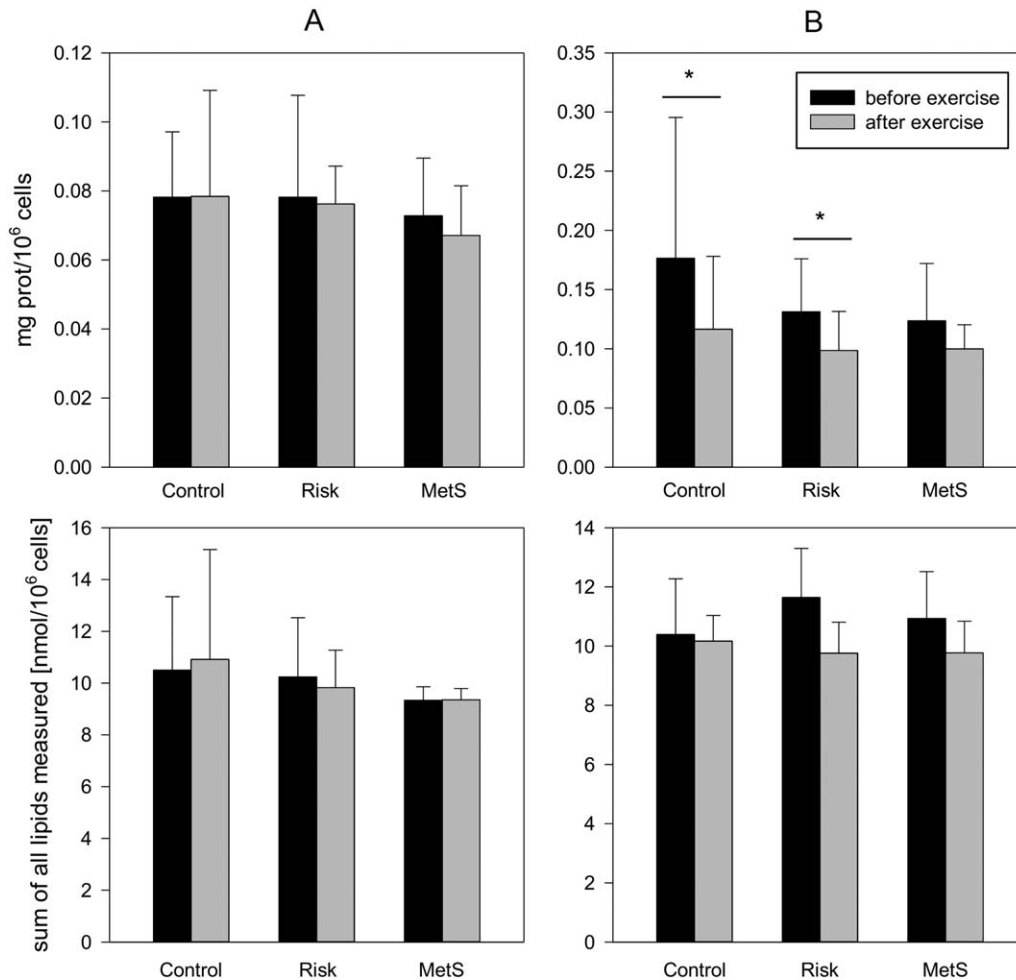


FIG. 4. Protein and lipid content of granulocytes (A) and monocytes (B), before and after exercise for the study groups. Given are the protein content [mg] per 10⁶ cells and the lipid content [nmol] per 10⁶ cells before and after 1 min of extensive exercise for granulocytes (A) and monocytes (B), respectively. In monocytes the protein content per cell decreased significantly through exercise in the control and risk group, but not in metabolic syndrome subjects (MetS). * $P < 0.05$, $n = 6-10$.

Unfortunately, a direct comparison with the data from Hong et al. is difficult because they did not present the fold change obtained after exercise separately for the two study groups or give an absolute number of mobilized cells.

We could furthermore demonstrate significantly different baseline levels of CD14^{bright}CD16^{pos} monocytes between the study groups. MetS patients showed a significantly higher count of these cells in peripheral blood and thus a lower MNP1/MNP2-ratio. Our findings therefore confirm previous publications, stating a higher level of CD16^{pos} monocytes in obese patients and persons suffering of hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia, high LDLc-levels, or low HDLc-levels (10,18,49). Since double positive monocytes are known to be generally proinflammatory (15), this fits well with overall higher levels of inflammatory parameters in MetS patients (3). In control and risk subjects the ratio of MNP1 and MNP2 cells decreased after exercise reaching that of MetS patients before exercise. Therefore, acute exercise

induces a distribution of monocyte subpopulations in control and risk subjects that is permanently present in MetS patients.

Besides, our data revealed that the absolute numbers of mobilized CD16^{pos} monocytes are not significantly different between the study groups. Despite their increased resting level of proinflammatory monocytes, MetS patients are able to mobilize the same amount of proinflammatory monocytes as healthy persons. Therefore, the higher basal level in MetS patients seems most likely to be caused by increased maturation rather than constant mobilization, as suggested previously (29).

Lymphocyte counts have been described before to increase after 1 min of strenuous exercise (25). In this study, we measured an approximate doubling compared to pre-exercise values in the control and risk group and a significantly lower fold change in the MetS group. We did not further investigate the mobilization of lymphocyte subpopulations as we put the emphasis on monocytes and their subsets. However, current research on

"Immunometabolism" highlights the importance of the immune system in metabolic regulation and therefore in the pathogenesis of type 2 diabetes and the MetS (8).

Another striking change we observed after exercise is a significant decrease in protein content of monocytes in the control group and risk group, and to a lesser, not significant extent in the MetS group. In contrast, total lipid content of monocytes did not change significantly after physical exercise. Also in granulocytes there was no significant change in protein or lipid content after exercise. Therefore, mobilized monocytes have to differ significantly in their protein composition from cells currently in circulation. On the other hand the lower basal values in conjunction with similar postexercise levels indicates differences in the protein composition of circulating monocytes from MetS patients as compared to control subjects. Unfortunately, within the scope of this study we were not able to perform a proteomic analysis of these cells, but this question is surely of high importance and will be addressed in a next step.

Although the current study is constrained in its scope by the limited number of subjects and the known high interindividual variation in exercise induced responses and monocyte counts (50), a significant mobilization of CD14^{pos}CD16^{pos} proinflammatory monocytes could be detected after 1 min of strenuous exercise. MetS patients had a higher basal percentage of proinflammatory CD16^{pos} monocytes in their circulation, probably due to increased maturation. They showed a comparable net increase in proinflammatory monocyte counts through exercise. Additionally, protein content in control and risk subjects was significantly decreased after exercise in monocytes, but not in granulocytes.

Clinically the question arises whether the mobilization of inflammatory monocytes contributes to the beneficial effect of exercise for the endothelial inflammatory part of vascular disease. It is therefore conceivable that acute strenuous exercise, even if it is not sufficient for weight loss, might exert a positive effect on vascular plaque formation by removing proinflammatory monocytes from the endothelium. This hypothesis however needs to be further investigated in long term studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for the excellent technical assistance of Alexandra Müller, Gabriele Hohenester, Daniela Wozny, and Helga Staudner.

DISCLOSURES

Prof. Gerd Schmitz is owner of Lipoconsult GmbH. The other authors declare no conflicts of interest.

LITERATURE CITED

- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;365:1415-1428.
- Sutherland JP, McKinley B, Eckel RH. The metabolic syndrome and inflammation. *Metab Syndr Relat Disord* 2004;2:82-104.
- Hutley L, Prins JB. Fat as an endocrine organ: Relationship to the metabolic syndrome. *Am J Med Sci* 2005;330:280-289.
- Ritchie SA, Ewart M-A, Perry CG, Connell JM, Salt IP. The role of insulin and the adipocytokines in regulation of vascular endothelial function. *Clin Sci* 2004;107:519-532.
- Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. Metabolic syndrome a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 2005;111:1448-1454.
- Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation* 2003;107:391-397.
- Fernandez-Real JM, Pickup JC. Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrin Metab* 2008;19:10-16.
- Mathis D, Shoelson SE. Immunometabolism: An emerging frontier. *Nat Rev Immunol* 2011;11:81-83.
- Schmitz G, Herr AS, Rothe G. T-lymphocytes and monocytes in atherogenesis. *Herz* 1998;23:168-177.
- Rothe G, Gabriel H, Kovacs E, Klucken J, Stoehr J, Kindermann W, Schmitz G. Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1437-1447.
- Ziegler-Heitbrock H. Heterogeneity of human blood monocytes: The CD14⁺ CD16⁺ subpopulation. *Immunol Today* 1996;17:424-428.
- Szeberényi JB, Rothe G, Pallinger É, Orsó E, Falus A, Schmitz G. Multi-color analysis of monocyte and dendritic cell precursor heterogeneity in whole blood. *Immunobiology* 2000;202:51-58.
- Schmitz G, Grandl M. Role of redox regulation and lipid rafts in macrophages during Ox-LDL-mediated foam cell formation. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:1499-1518.
- Kapinsky M, Torzewski M, Buechler C, Duong CQ, Rothe G, Schmitz G. Enzymatically degraded LDL preferentially binds to CD14^{high} CD16⁺ monocytes and induces foam cell formation mediated only in part by the class B scavenger-receptor CD36. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1004-1010.
- Ziegler-Heitbrock H. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: Their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 2007;81:584-592.
- Schmitz G, Orsó E, Rothe G, Klucken J. Scavenging, signalling and adhesion coupling in macrophages: implications for atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* 1997;8:287-300.
- Ziegler-Heitbrock H, Fingerle G, Stroebel M, Schraut W, Stelter F, Schuett C, Passlick B, Pforte A. The novel subset of CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol* 1993;23:2053-2058.
- Rothe G, Herr AS, Stoehr J, Abletshauser C, Weidinger G, Schmitz G. A more mature phenotype of blood mononuclear phagocytes is induced by fluvastatin treatment in hypercholesterolemic patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1999;144:251-261.
- Sigruener A, Buechler C, Bared SM, Grandl M, Aslanidis C, Ugocsai P, Gehrmann M, Schmitz G. E-LDL upregulates TOSO expression and enhances the survival of human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;359:723-728.
- Orsó E, Grandl M, Schmitz G. Oxidized LDL-induced endolysosomal phospholipidosis and enzymatically modified LDL-induced foam cell formation determine specific lipid species modulation in human macrophages. *Chem Phys Lipids* 2011;164:479-487.
- Pulliam L, Sun B, Rempel H. Invasive chronic inflammatory monocyte phenotype in subjects with high HIV-1 viral load. *J Neuroimmunol* 2004;157:93-98.
- Saleh M, Goldman S, LoBuglio A, Beall A, Sabio H, McCord M, Minasian L, Alpaugh R, Weiner L, Munn D. CD16⁺ monocytes in patients with cancer: Spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1995;85:2910-2917.
- Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Stroebel M, Ziegler-Heitbrock H. The novel subset of CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 1993;82:3170-3176.
- Park SH, Park BG, Park C-J, Kim S, Kim D-H, Jang S, Hong S-K, Chi H-S. An extended leukocyte differential count (16 types of circulating leukocytes) using the cytodiff flow cytometric system can provide information for the discrimination of sepsis severity and prediction of outcome in sepsis patients. *Cytom Part B: Clin Cytom* 2014;86:244-256.
- Gabriel H, Kindermann W. The acute immune response to exercise: What does it mean? *Int J Sports Med* 1997;18:S28.
- Gabriel H, Urhausen A, Kindermann W. Mobilization of circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations during and after short, anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1992;65:164-170.

27. McCarthy D, Dale M. The leucocytosis of exercise. *Sports Med* 1988;6:333-363.
28. Gabriel H, Urhausen A, Brechtel L, Mueller H-J, Kindermann W. Alterations of regular and mature monocytes are distinct, and dependent of intensity and duration of exercise. *Eur J Appl Physiol Occupat Physiol* 1994;69:179-181.
29. Steppich B, Dayyani F, Gruber R, Lorenz R, Mack M, Ziegler-Heitbrock H. Selective mobilization of CD14⁺ CD16⁺ monocytes by exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C578-C586.
30. Athens J, Haab O, Raab S, Mauer A, Ashenbrucker H, Cartwright G, Wintrobe M. Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. *J Clin Invest* 1961;40:989.
31. Pabst R, Binns RM, Licence ST, Peter M. Evidence of a selective major vascular marginal pool of lymphocytes in the lung. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:1213-1218.
32. Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* 2003;24:326-333.
33. Ottaway CA, Husband AJ. The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration. *Immunol Today* 1994;15:511-517.
34. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo J-L, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 2009;325:612-616.
35. Zawada AM, Fell LH, Untersteller K, Seiler S, Rogacev KS, Fliser D, Ziegler-Heitbrock L, Heine GH. Comparison of two different strategies for human monocyte subsets gating within the large-scale prospective CARE FOR HOME study. *Cytometry A* 2015;87:750-758.
36. Ecker J, Liebisch G, Englmaier M, Grandl M, Robenek H, Schmitz G. Induction of fatty acid synthesis is a key requirement for phagocytic differentiation of human monocytes. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107:7817-7822.
37. Leidl K, Liebisch G, Richter D, Schmitz G. Mass spectrometric analysis of lipid species of human circulating blood cells. *Biochim et Biophys Acta (BBA) Mol Cell Biol Lipids* 2008;1781:655-664.
38. Liebisch G, Binder M, Schifferer R, Langmann T, Schulz B, Schmitz G. High throughput quantification of cholesterol and cholesteryl ester by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *Biochim Biophys Acta (BBA)-Mol Cell Biol Lipids* 2006;1761:121-128.
39. Liebisch G, Drobnik W, Lieser B, Schmitz G. High-throughput quantification of lysophosphatidylcholine by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2002;48:2217-2224.
40. Liebisch G, Drobnik W, Reil M, Truembach B, Arnecke R, Olgemoeller B, Roscher A, Schmitz G. Quantitative measurement of different ceramide species from crude cellular extracts by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *J Lipid Res* 1999;40:1539-1546.
41. Liebisch G, Lieser B, Rathenberg J, Drobnik W, Schmitz G. High-throughput quantification of phosphatidylcholine and sphingomyelin by electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled with isotope correction algorithm. *Biochim Biophys Acta (BBA) Mol Cell Biol Lipids* 2004;1686:108-117.
42. Scherer M, Leuthauser-Jaschinski K, Ecker J, Schmitz G, Liebisch G. A rapid and quantitative LC-MS/MS method to profile sphingolipids. *J Lipid Res* 2010;51:2001-2011.
43. Scherer M, Schmitz G, Liebisch G. High-throughput analysis of sphingosine 1-phosphate, sphinganine 1-phosphate, and lysophosphatidic acid in plasma samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2009;55:1218-1222.
44. Scherer M, Schmitz G, Liebisch G. Simultaneous quantification of cardiolipin, bis (monoacylglycerol) phosphate and their precursors by hydrophilic interaction LC-MS/MS including correction of isotopic overlap. *Anal Chem* 2010;82:8794-8799.
45. Dill D, Costill DL. Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol* 1974;37:247-248.
46. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC. Diagnosis and management of the metabolic syndrome an American Heart Association/ National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation* 2005;112:2735-2752.
47. Heimbeck I, Hofer TP, Eder C, Wright AK, Frankenberger M, Marci A, Boghdadi G, Scherberich J, Ziegler-Heitbrock L. Standardized single-platform assay for human monocyte subpopulations: Lower CD14⁺CD16⁺⁺ monocytes in females. *Cytometry A* 2010;77:823-830.
48. Hong S, Mills PJ. Effects of an exercise challenge on mobilization and surface marker expression of monocyte subsets in individuals with normal vs. elevated blood pressure. *Brain Behav Immun* 2008;22:590-599.
49. Poitou C, Dalmás E, Renovato M, Benhamo V, Hajduch E, Abdenmour M, Kahn J-F, Veyrie N, Rizkalla S, Fridman W-H. CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ monocytes in obesity and during weight loss relationships with fat mass and subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:2322-2330.
50. Hudig D, Hunter KW, Diamond WJ, Redelman D. Properties of human blood monocytes ii. monocytes from healthy adults are highly heterogeneous within and among individuals. *Cytometry Part B: Clin Cytom* 2013;86:121-134.

3. Vorträge und Posterpräsentationen

Posterpräsentation:

Identification of specific biomarkers for metabolic diseases in the mobilized marginal pool following exercise

Ralph Wonner, Stefan Wallner, Evelyn Orsó, Markus Peer and Gerd Schmitz

LipidomicNet Meeting, Bratislava, 01/2012

Mündlicher Vortrag:

Identification of specific biomarkers for metabolic diseases in the mobilized marginal blood compartment following exercise,

Ralph Wonner, Markus Peer, Evelyn Orsó, Gerhard Liebisch, Gerd Schmitz, Stefan Wallner

LipidomicNet Workshop, Wien, 07/2012

4. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. med. Stefan Wallner, der mir mit seinem außerordentlichen Engagement und mit Rat und Tat während der Durchführung und Verfassung dieser Arbeit stets zur Seite stand und mich mit seiner Motivation durch manchen Tiefpunkt gebracht hat.

Des Weiteren möchte ich Evelyn Orsó, Gerhard Liebisch und Markus Peer danken, die mich bei konkreten Fragestellungen und Problemen stets kompetent beraten haben.

Ein weiterer Dank geht an die exzellente technische Unterstützung von Alexandra Müller, Gabriele Hohenester, Daniela Wozny sowie Helga Staudner.

Auch bei meiner lieben Familie, die mir das Studium und die Promotion ermöglicht haben, sowie bei meiner langjährigen Partnerin Cornelia Töpert möchte ich mich für die motivierende Unterstützung herzlich bedanken.

5. Lebenslauf

Name Ralph Wonner
geboren 11.02.1988 in Agnetsheln/ Rumänien
Staatsangehörigkeit deutsch

Schul Ausbildung

1994 - 1998 Volksschule Himmelkron
1998 - 2007 Graf-Münster-Gymnasium, Bayreuth

Hochschulausbildung

10/2007 – 02/2013 Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg
08/2009 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Physikumsnote: 1,0
05/2014 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Abschlussnote: 1,0

Klinische Erfahrungen

2010 – 2013 Famulaturen in den Fachgebieten Kardiologie, Rechtsmedizin,
Plastische und Rekonstruktive Chirurgie, Gynäkologie und
Geburtshilfe,
2013 – 2014 Praktisches Jahr, Wahlfach: Plastische Chirurgie
ab 2015 Assistenzarzt in der Klinik für Gefäßchirurgie, Krankenhaus der
Barmherzigen Brüder Regensburg